



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Lipidómica de las microalgas nativas para la
identificación de compuestos bioactivos con aplicación
al biocomercio**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Productos
Naturales y Biocomercio

AUTOR

Leenin FLORES RAMOS

ASESORES

MSc. Celia Bertha VARGAS DE LA CRUZ

Mg. Richard Andi SOLORZANO ACOSTA (Coasesor)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Flores L. Lipidómica de las microalgas nativas para la identificación de compuestos bioactivos con aplicación al biocomercio [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0002-6099-4321
DNI o pasaporte del autor	42573270
Código ORCID del asesor	0000-0001-9187-5504
DNI o pasaporte del asesor	42354741
Grupo de investigación	BIOTECHNOLOGY AND OMICS IN LIFE SCIENCES – BIOLIFS - Resol. Rectoral 01199-R-19
Agencia financiadora	<ul style="list-style-type: none"> - País de la agencia financiadora: Perú - Nombre y siglas de la agencia financiadora: Instituto del Mar del Perú – IMARPE - Nombre del programa financiero: Programa Presupuestal N° 0094: Ordenamiento y Desarrollo de la Acuicultura - Proyecto “Evaluación de biomoléculas de organismos acuáticos” - Número de contrato: “-”
Año o rango de años que la investigación abarcó.	2019
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Lugar (obligatorio): Laboratorio de Análisis Instrumental – Instituto del Mar del Perú.</p> <p>Coordenadas geográficas (obligatorio): 12°04’01’’S 77°09’27’’S</p>
Disciplinas OCDE	<p>CIENCIAS DE LA SALUD</p> <p>Farmacía http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05</p> <p>Bioquímica</p> <p>http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</p>

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN PRODUCTOS NATURALES Y BIOCOMERCIO**

Siendo las **03:00 pm.** del **02 de julio de 2020** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera e integrado por los siguientes miembros: Msc. Celia Bertha Vargas de la Cruz (asesora), Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar y Mg. Oscar Herrera Calderon; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**Lipidómica de las microalgas nativas para la identificación de compuestos bioactivos con aplicación al biocomercio**", presentado por el Bachiller en Química **LEENIN FLORES RAMOS**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Productos Naturales y Biocomercio**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Excelente 19

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Química **LEENIN FLORES RAMOS**, el Grado Académico de **Magíster en Productos Naturales y Biocomercio**.

Siendo las **4.40** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **4.50** hrs. del **02 de julio de 2020**.

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (P.P., T.C.)
Presidente

Msc. Celia Bertha Vargas de la Cruz (P. Aux., T.C.)
Miembro - Asesora

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Mg. Oscar Herrera Calderon (P. Aux. T.C.)
Miembro

Observaciones:

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2. Aspectos teóricos.....	5
2.2.1. Microalgas.....	5
2.2.2. Tecnologías de producción de las microalgas.....	6
2.2.3. Lípidos de microalgas.....	7
2.2.4. Nomenclatura de los lípidos polares.....	8
2.2.5. Espectrometría de masas de tiempo de vuelo.....	9
2.2.6. Caracterización química de lípidos.....	10
2.2.7. Biocomercio.....	12
2.2.8. Mercado de las microalgas.....	15
2.2.9. Diseño de experimentos.....	15
2.2.10. Análisis de componentes principales.....	17
2.2.11. Glosario.....	18
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	19
3.1. Reactivos.....	19
3.2. Equipos.....	19
3.3. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales.....	19
3.4. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares.....	20
3.5. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas.....	22
3.6. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados.....	23

CAPÍTULO IV. RESULTADOS	24
4.1. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales	24
4.2. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares	27
4.3. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas	32
4.4. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados	38
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	40
5.1. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales	40
5.2. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares	41
5.3. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas	43
5.4. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados	45
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	49
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
CAPÍTULO VIII. ANEXOS	60

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio lipidómico de las microalgas nativas para la identificación de compuestos bioactivos con aplicación al biocomercio. Para lograrlo se optimizaron los factores que influyen en la extracción de lípidos de las microalgas *Nannochloropsis oceanica* y *Desmodesmus asymmetricus* obteniendo la relación masa/solvente de 25 mg/3 mL. La composición del solvente de extracción cloroformo/metanol fue 1:1 y el tiempo del baño de ultrasonido de 30 min. Luego se determinó el efecto de los factores en la señal de los lípidos polares en el espectrómetro de masas, obteniendo que la detección del ion molecular depende de la energía de colisión y el modo de ionización, y el tiempo de retención depende del pH de la fase móvil y cada efecto es característico de cada clase de lípido identificado. Luego se analizó la composición de los lípidos polares de tres Phylum de microalgas nativas mantenidas en el Banco de Germoplasma de Organismo Acuáticos – IMARPE: ocho cepas de *Bacillariophyta*, nueve de *Chlorophyta* y ocho de *Cyanophyta*, identificando los lípidos polares: MGDG, DGDG, SQDG, PG, DGTS y Cer, que al ser analizadas mostraron lípidos característicos de cada Phylum, los cuales pueden ser usados como marcadores en estudios quimio-taxonómicos. Finalmente, de acuerdo a nuestro análisis, los lípidos polares de muchas de estas microalgas tienen alto potencial para su aplicación en el biocomercio como ingredientes para la cosmética y la farmacéutica.

Palabras clave: Microalga, lipidómica, glicolípido, fosfolípido, lípido de betaína.

ABSTRACT

This thesis focuses on a lipidomic study of native microalgae for the identification of bioactive compounds with application to biotrade. To achieve this, we optimized the lipid extraction factors of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* and *Desmodesmus asymmetricus*, obtaining the mass/solvent ratio of 25 mg/3 mL, the extraction solvent composition of chloroform/methanol 1:1 and the ultrasound bath time of 30 min. Then, we determined the effect factors on the polar lipid mass spectrometer signal, obtaining that the molecular ion detection depends on the collision energy and the ionization mode, the retention time depends on the mobile phase pH and each effect is characteristic of each class of lipid identified. Next, we analyzed the polar lipid composition of three native microalgae Phylum, maintained in the Aquatic Organism Germplasm Bank - IMARPE: eight *Bacillariophyta* strains, nine *Chlorophyta* and eight *Cyanophyta*, identifying polar lipids like MGDG, DGDG, SQDG, PG, DGTS and Cer. When they were analyzed, they showed characteristic lipids of each Phylum, which can be used as markers in chemotaxonomic studies. Finally, according to our analysis, the polar lipids of many of these microalgae have high potential for application in biotrade as ingredients for cosmetics and pharmaceuticals.

Keywords: Microalgae, lipidomic, glycolipid, phospholipid, betaine lipid.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de lípidos polares.	9
Tabla 2. Relaciones m/z de fragmentos más comunes en las clases de lípidos polares.	11
Tabla 3. Relaciones m/z de los fragmentos de ácidos grasos más comunes.	11
Tabla 4. Principios y criterios del biocomercio.	13
Tabla 5. Selección del diseño de experimentos.	16
Tabla 6. Factores y niveles del diseño de superficies.	19
Tabla 7. Factores y niveles del diseño factorial completo.	21
Tabla 8. Microalgas seleccionadas para el screening de lípidos polares	22
Tabla 9. Diseño de superficies de Box Behnken y resultados del porcentaje de lípidos (%Lip) de las microalgas Np y Des.	24
Tabla 10. ANOVA del diseño de superficies de la microalga Np.	25
Tabla 11. ANOVA del diseño de superficies de la microalga Des.	25
Tabla 12. Condiciones óptimas de los factores del diseño de superficies.	26
Tabla 13. Comparación del %Lip max Exp versus %Lip max Pred.	26
Tabla 14. Porcentaje promedio de las fracciones lipídicas (%F).	27
Tabla 15. Lípidos polares identificados, en modo ESI (-), microalgas Np (Izquierda) y Des (Derecha).	28
Tabla 16. Efectos principales y p-valor del área relativa del ion molecular (A_{rel}) de los lípidos más intensos de cada clase de la fracción F3.	30
Tabla 17. Efectos principales y p-valor del tiempo de retención del ion molecular (TR) de los lípidos más intensos de cada clase de la fracción F3.	31
Tabla 18. Concentración de lípidos totales (Lip) y lípidos polares (F3) en los cultivos de microalgas nativas.	32
Tabla 19. Número de lípidos identificados en las microalgas nativas.	33
Tabla 20. Número de lípidos caracterizados del Phylum <i>Bacillariophyta</i>	33
Tabla 21. Número de lípidos caracterizados del Phylum <i>Chlorophyta</i>	34
Tabla 22. Número de lípidos caracterizados del Phylum <i>Cyanophyta</i>	36
Tabla 23. Patentes relacionadas a los lípidos polares.	39
Tabla 24. Propuesta de marcadores quimio-taxonómicos de los Phylum analizados. ...	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de superficies del %Lip vs w, S, t = 10 min (Izquierda: Np, Derecha: Des).....	27
Figura 2. Cromatograma típico de la microalga Np en modo ESI (-).	29
Figura 3. Cromatograma típico de la microalga Des en modo ESI (-).	30
Figura 4. PCA de los lípidos polares	38
Figura 5. Fotos de las microalgas <i>Nannochloropsis oceanica</i> (Izquierda) y <i>Desmodesmus asymmetricus</i> (Derecha), Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos-IMARPE.	41
Figura 6. Cromatograma típico de la microalga <i>Ankistrodesmus falcatus</i> en modo ESI (-).....	44
Figura 7. Flujograma de la extracción de lípidos totales.	60
Figura 8. Espectro de masas típicos de las fitoceramidas Cer AP y Cer NP de la microalga <i>Ankistrodesmus falcatus</i>	61
Figura 9. Fotos de microalgas del Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú ⁷⁹ . a: <i>Pediastrum</i> sp., b: <i>Skeletonema costatum</i> , c: <i>Arthrospira platensis</i> , d: <i>Ankistrodesmus</i> sp., e: <i>Prorocentrum micans</i> , f: <i>Alexandrium</i> sp.....	61
Figura 10. Estructuras químicas de los glicolípidos, fosfolípidos y lípidos de betaína. .	62
Figura 11. Esquema de la ruta de síntesis de lípidos polares y neutros en microalgas, extraído de Mimouni, <i>et al.</i> ¹⁸	63
Figura 12. Herramientas analíticas más usadas en el análisis de lípidos, extraído de Li-Beisson, <i>et al.</i> ²¹	63
Figura 13. Proceso de crear, validar y aplicar los espectros MS/MS generados in-silico en el software Lipidblast, extraído de Cajka, <i>et al.</i> ²²	64
Figura 14. Esquema del espectrómetro de masas Waters Xevo G2-XS QTOF.	65
Figura 15. Espectros de masas típicos identificados.....	67

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El Perú es reconocido a nivel mundial como país megadiverso, y aunque se cultivan productos nativos con aplicación al biocomercio, como la maca (*Lepidium meyenii*) y la quinua (*Chenopodium quinoa*), existen muchas especies marinas y continentales con potencial económico aún sin investigar.

En particular las microalgas nativas han sido poco investigadas en el país y se está dejando de aprovechar una valiosa fuente de nuestra biodiversidad que, en otros países como Japón, con el caso de la microalga *Chlorella* sp., lo vienen explotando de modo comercial en cultivos masivos desde los años 1960s.

Una de las iniciativas que trata de contrarrestar esta problemática es la ofrecida por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt), por el cual se ha logrado articular algunas instituciones de investigación como el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) con empresas privadas como Cosmo Ingredients S.A.C. y PSW S.A. Para desarrollar proyectos de investigación aplicada con microalgas, como es el caso del biodiesel, ingredientes cosméticos y ácidos grasos poliinsaturados de microalgas, pero aún es insuficiente porque se necesitan herramientas modernas que nos permitan ampliar esas investigaciones.

Con la reciente adquisición del espectrómetro de masas Waters Xevo G2-XS QTof, por parte del IMARPE, se planea disminuir la brecha que existe en la línea de investigación de lipidómica de microalgas nativas, que antes solo estaba enfocado en el estudio de los ácidos grasos, y lograr explorar con mayor profundidad los recursos de nuestra biodiversidad acuática. Para ello, contamos con la colección de cepas de microalgas del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del IMARPE, que a lo largo de los años de actividad ha logrado obtener una colección de microalgas nativas de más de 400 cepas con la necesidad de investigar su potencial económico, para lograr este propósito, se plantea los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general

Realizar el estudio lipidómico de las microalgas nativas para la identificación de compuestos bioactivos con aplicación al biocomercio.

1.2. Objetivos específicos

- (1) Optimizar el proceso de extracción de los lípidos totales de las microalgas nativas mediante el diseño de superficies de Box-Behnken.
- (2) Evaluar el efecto de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares mediante el diseño factorial completo.
- (3) Analizar la composición química de las fracciones de lípidos polares de las microalgas nativas mediante el método optimizado.
- (4) Realizar un estudio de análisis de componentes principales (PCA) y determinar el potencial de los compuestos identificados.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Jones, *et al.*¹, en el año 2012, evaluaron varios solventes para determinar la efectividad en la extracción de lípidos neutros de las algas y analizar su contenido por HPLC-ELSD, NMR y GC-MS y desarrollaron un método con un alto rendimiento de extracción de lípidos. La composición de los lípidos extraídos tuvo un alto grado de saturación.

Li, *et al.*², en el año 2015 exploraron la relación quimio-taxonomica de las especies de *Nannochloropsis oceanica* morfológicamente similares mediante la determinación del perfil lipidómico basado en análisis multivariado y la técnica del UPLC-Q-TOF-MS. Determinaron que el perfil lipidómico y el uso de análisis multivariado proporcionaron claras evidencias para diferenciar dos especies de microalga *Nannochloropsis oceanica* codificadas por NMBluh014 y NMBluh-X, además que se identificaron marcadores potenciales para un estudio quimio-taxonomico.

Yao, *et al.*³, en el año 2015, publicaron datos de la composición de ácidos grasos, clases de lípidos y contenido de clorofilas de 5 especies diferentes de microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus* sp., y *Schizochytrium limacinum* obtenidas mediante las técnicas de TLC, GC-FID, ESI-MS/MS, y LC/APCI-MS, obteniendo el perfil lipídico de 5 microalgas de agua dulce y agua salada. Todas las microalgas analizadas obtuvieron altas concentraciones de ácidos grasos omega-3, Las *Nannochloropsis* y *Chlamydomonas* obtuvieron altas cantidades de glicolípidos, las microalgas de agua dulce concentraron altas cantidades de fitoesteroles y las metodologías que desarrollaron sirvieron para optimizar los procesos de producción con alto valor agregado de las microalgas.

da Costa, *et al.*⁴, en el año 2016, publicaron una revisión donde presentaron el análisis de técnicas de espectrometría de masas orientado al estudio de los glicolípidos de las microalgas y sus potenciales propiedades bioactivas, concluyendo que la espectrometría de masas es una valiosa herramienta para el estudio de los glicolípidos

y que estos contienen promisorias actividades anti-virales, antiinflamatorias y antitumorales.

Rodríguez-Luna, *et al.*⁵, en el año 2017, demostraron por primera vez el efecto preventivo de una administración tópica de extractos de glicolípidos MGMG y MGDG de la microalga *Isochrysis galbana*, en el modelo inflamatorio de la hiperplasia cutánea inducida por TPA. La aplicación tópica de la crema de MGDG mejoró la permeabilidad del preparado y, en consecuencia, incrementó los efectos preventivos del producto.

Dahli, *et al.*⁶, en el año 2018, demostraron que el extracto de lyso-DGTS aislado de la microalga *Nannochloropsis* sp. tiene el potencial de disminuir el riesgo de arterosclerosis al mejorar la actividad del PON1, mejorar la calidad de HDL, proteger los macrófagos y prevenir la formación de células de espuma, lo que potencialmente reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Muhammad, *et al.*⁷, en el año 2018, publicaron una revisión donde concluyeron que las microalgas son fuentes económicas, renovables y sostenibles de biocombustibles, compuestos farmacológicos e ingredientes alimentarios con aplicaciones a la industria de bioenergía, nutracéutica y farmacéutica, aunque existen desafíos y limitaciones que se deben superar para hacerlos viables para la comercialización.

Gatamaneni, *et al.*⁸, en el año 2018, publicaron una revisión donde mencionan que la industria de las microalgas aún se encuentra en su infancia, y es vista como una industria multibillonaria en los años que vendrán, se debe investigar en biorefinería de la biomasa microalgal para que los productos derivados de las microalgas sean más rentables y competitivos con respecto de otras fuentes. La bioprospección y selección de las cepas de microalgas en conjunto con la ingeniería genética son la clave para lograr una tecnología exitosa.

Barkia, *et al.*⁹, en el año 2019, publicaron una revisión donde indican que los principales retos para cultivar las microalgas son los altos costos de los sistemas de cultivo, mantenimiento y procesos de biorefinería, a pesar de estos inconvenientes, existe una alta demanda por los ingredientes de microalgas en suplementos alimenticios y fármacos potenciales.

Ran, *et al.*¹⁰, en el año 2019, publicaron una revisión de los métodos más utilizados para incrementar el contenido de lípidos de las microalgas, concluyendo que el stress por déficit de nitrógeno es la estrategia más ampliamente utilizada, aunque el stress por déficit de azufre se ve como más prometedora, también el alivio del stress oxidativo causado por el déficit de nutrientes puede incrementar aún más el rendimiento de producción de lípidos.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Microalgas

Las microalgas conforman un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos con una estructura simple, rápido crecimiento celular y una alta producción de biomasa¹¹. Además, representan una gran reserva de biocompuestos, la cual está constituida principalmente por carbohidratos, proteínas y lípidos y también son capaces de producir otros biocompuestos, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes y biotoxinas, muchos de ellos únicos e interesantes que se mantienen sin explorar, y son acumulados como estrategias de defensa en el medio acuático¹². Existen en diversos ecosistemas acuáticos y a pesar de que se conocen más de 50000 especies de ellas, solo se han estudiado alrededor de 30000¹³.

Debido a la gran diversidad de estos, Borowitzka¹⁴, muestra una parte de su clasificación de acuerdo a los géneros más estudiados: las algas verde-azuladas (Cyanobacteria), Euglenophyta, Haptophyta, los dinoflagelados (Dinophyceae), las diatomeas (Bacillariophyceae), Eustigmatophyceae, las algas rojas (Rhodophyta) y las algas verdes (Chlorophyta/Charophyta), algunos ejemplos de las especies se muestran en la figura 9 (Anexo). Todos estos géneros contribuyen en la fijación del carbono inorgánico para producir oxígeno mediante la fotosíntesis, producen alrededor del 50 % del oxígeno de la Tierra, también contribuyen con la fijación del nitrógeno elemental (N₂), como es el caso de la cianobacteria *Trichodesmium*, el cual es responsable de una importante cantidad de la fijación del nitrógeno total del planeta. Otro importante rol que desempeñan, es la de ser los productores primarios de toda

la cadena alimenticia acuática, y sirven de alimento esencial para las larvas y juveniles de crustáceos, moluscos y peces.

En las últimas décadas, se investigan como nuevas fuentes de biocompuestos para los sectores nutricional, energético, agrícola, acuícola y cosmético, ya que las microalgas pueden constituir una fuente alternativa, renovable y ecológica muy eficiente gracias a su capacidad de convertir la energía solar en biocompuestos útiles a una velocidad mucho mayor que cualquier otra fuente vegetal. Se investigan como fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), biodiesel, bioetanol, suplementos proteínicos, colorantes, biofertilizantes, antioxidantes y en tratamientos de aguas residuales¹⁵. Por otro lado, existe un gran interés por parte de los consumidores por adquirir productos alimenticios o suplementos dietéticos que pueden beneficiar su salud, prevenir y curar algunas enfermedades. Debido a ello, los consumidores están impulsando la demanda de productos que tienen como objetivo promover una mejor salud y prevenir la aparición de enfermedades crónicas, por lo tanto, el uso de biomasa de microalgas o sus metabolitos derivados se han convertido en un enfoque innovador para el desarrollo de productos alimenticios más saludables¹⁶.

2.2.2. Tecnologías de producción de las microalgas

La FAO¹⁷, resume todas las etapas que actualmente se vienen utilizando en los laboratorios y las fábricas de producción de microalgas. Primero, la selección del medio de cultivo adecuado para la cepa de la microalga. Uno de los más utilizados es el medio de Guillard F/2, el cual consta de una solución de nitratos y fosfatos, una solución de silicatos, una solución de metales traza y una solución de vitaminas. Segundo, se debe considerar los factores críticos para el desarrollo de las microalgas: la intensidad lumínica, el pH, la aireación, la agitación, la temperatura y la salinidad, que van a depender exclusivamente de la cepa de la microalga y se deben de optimizar para cada una de ellas. Tercero, se debe determinar la curva de crecimiento para determinar la fase de latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte, la clave para obtener una producción exitosa es mantener los cultivos en la fase exponencial.

Con estas consideraciones se debe seleccionar la tecnología de cultivo adecuada a las necesidades. El cultivo tipo Batch utiliza un inóculo que crece gradualmente sin llegar a la fase estacionaria, por ejemplo, se comienza con un tubo de ensayo, luego matraces de 2 L, botellas de 5 a 20 L, cilindros de 160 litros, tanques de 500 L y así sucesivamente.

Una ventaja es que es simple de hacer, no es el más eficiente, pero es flexible, una desventaja es que difícil controlar la contaminación en etapas iniciales de inóculo, cualquier contaminante con una tasa de crecimiento mayor puede dañar el cultivo, también requiere mayor trabajo en la cosecha, limpieza, esterilización, rellenado, e inóculo de los contenedores. El cultivo tipo continuo, consiste en bombear medio de cultivo fresco a una cámara de crecimiento y el exceso de cultivo se cosecha simultáneamente. Este cultivo tiene la ventaja de producir microalga con una calidad predecible y puede ser automatizado, la desventaja es que es de mayor costo y complejidad. En el cultivo tipo semi-continuo, se cosecha una parte del cultivo y se completa con medio de cultivo fresco.

Luego del cultivo se debe seleccionar un método de cosecha, actualmente se utilizan la sedimentación, centrifugación, floculación y filtración, entre el 20 a 30% del costo de la biomasa va a depender de esta etapa por lo cual es importante su adecuada selección. Todas estas etapas están en constante innovación para determinar la mejor tecnología que permita reducir los costos de producción.

2.2.3. Lípidos de microalgas

De acuerdo a Mimouni, *et al.*¹⁸, los lípidos más abundantes en las microalgas se pueden clasificar en dos tipos: *lípidos neutros* como los fitoesteroles, ácidos grasos (FA) y glicerolípidos neutros (monoacilglicerol MAG, diacilglicerol DAG y triacilglicerol TAG), y *lípidos polares*, como los glicolípidos (GL), fosfolípidos (PL) y lípidos de betaína (BL), (Fig. 10, anexo), estos son sintetizados en los tilacoides y en el retículo endoplasmático. Entre los lípidos polares, los GL son específicos de la membrana de lípidos de los cloroplastos

y los PL y BL son componentes de la membrana del retículo endoplasmático. Los triacilgliceroles son almacenados en el citosol como gotas y específicamente bajo condiciones de stress.

La ruta metabólica de la síntesis de los lípidos en las microalgas se muestra en la figura 11 (Anexo), se observa que el ácido fosfatídico (PA) es el intermediario común de todas las clases de lípidos y el glicerol-3-fosfato (Glicerol 3-P) provee el esqueleto de glicerol para la síntesis de PA. En el cloroplasto, se observan dos rutas, una para la formación de los lípidos neutros TAG y otra para la formación de los lípidos polares SQDG, MGDG y DGDG, ambos conteniendo como punto de partida al DAG. Caso similar en el retículo endoplasmático, pero esta vez los lípidos polares formados son los PC, PE, PI y DGTS.

De otro lado, los lípidos de las microalgas presentan múltiples beneficios para la salud humana, por ejemplo, los PUFAs, en particular el EPA, ARA y DHA, reducen la presión de la sangre, mejoran las funciones del corazón y el hígado, tienen propiedades como antiarteriosclerosis, antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, antitrombótico y antiarrítmico. Los MGDG poseen efectos antitumorales, los SQDG poseen actividad antitumoral, antiinflamatoria, antimicrobiano y protector contra la muerte celular. Los PL poseen propiedades antibacteriales, antivirales, antitumorales y antimicrobianos. El grupo colina, mayor componente de la fosfatidilcolina (PC), tiene la función de donador del grupo metilo y es precursor del neurotransmisor de acetilcolina.

2.2.4. Nomenclatura de los lípidos polares

Los lípidos forman un conjunto de diversos grupos de moléculas, por ello en la actualidad aún no existe un consenso absoluto acerca de su nomenclatura, en este trabajo se utilizará la nomenclatura publicada por MS-DIAL¹⁹ que se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura de lípidos polares.

Categorías	Clase Principal	Clase de lípido	Abreviatura	Descripción: cadena sumada	Descripción: cadena separada
Glicerolípidos [GL]	Glicosilradilglicerol [GL05]	Digalactosiladiacilglicerol	DGDG	DGDG(34:1)	DGDG(16:0/18:1)
		Monogalactosiladiacilglicerol	MGDG	MGDG(34:1)	MGDG(16:0/18:1)
		Sulfoquinovosil diacilglicerol	SQDG	SQDG(34:1)	SQDG(16:0/18:1)
	Otros glicerolípidos [GL00]	Diacilgliceril trimetilhomoserina/diacilgliceril hidroximetilo- <i>N,N,N</i> -trimetil-β-alanina	DGTS/A	DGTS (34:1)	DGTS(16:0/18:1)
Glicerofosfolípidos [GP]	Glicerofosfolinas [GP01]	Lisofofatidilcolina	LPC	LPC(18:1)	LPC(18:1)
		Fosfatidilcolina	PC	PC(38:4)	PC(18:0/20:4)
	Glicerofosfoetanolaminas [GP02]	Lisofofatidiletanolamina	LPE	LPE(18:1)	LPE(18:1)
		Fosfatidiletanolamina	PE	PE(38:4)	PE(18:0/20:4)
	Glicerofosfoglicérols [GP04]	Lisofofatidilglicerol	LPG	LPG(18:1)	LPG(18:1)
		Fosfatidilglicerol	PG	PG(38:4)	PG(18:0/20:4)
	Glicerofosfoinosítoles [GP06]	Lisofofatidilinositol	LPI	LPI(18:1)	LPI(18:1)
		Fosfatidilinositol	PI	PI(38:4)	PI(18:0/20:4)
	Glicerofosfoserinas [GP03]	Lisofofatidilserina	LPS	LPS(18:0)	LPS(18:0)
		Fosfatidilserina	PS	PS(38:4)	PS(18:0/20:4)
Esfinbolípidos [SP]	Ceramidas [SP02]	Ceramida no-hidroxi ácido graso-fitoesfingosina	Cer-NP	Cer-NP(t34:0)	Cer-NP(t18:0/16:0)
		Ceramida alfa-hidroxi ácido graso-fitoesfingosina	Cer-AP	Cer-AP(t42:1+O)	Cer-AP(t18:1/24:0+O)

2.2.5. Espectrometría de masas de tiempo de vuelo

El primer espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), fue comercializado a finales de los años 1950s por Bendix Corporation, desde sus primeros años de creación fue un instrumento con gran atractivo debido a su potencialmente ilimitado rango masa-carga (m/z), alta velocidad de adquisición, masa exacta y sensibilidad, sin embargo, tenían problemas técnicos que afectaban el poder de resolución y la masa exacta. La adición del reflectrón, entre los años 1970s y 1990s, mejoró la resolución de la masa y luego con la combinación de la aceleración ortogonal (oa) se mejoró aún más el poder de resolución y la masa exacta²⁰. La figura 14 (Anexo) muestra las partes de un equipo comercial de la actualidad, cabe resaltar que aunque cada compañía tiene sus propias mejoras tecnológicas el equipo aún se valora por su alto poder de resolución y masa exacta.

La ecuación que determina la relación m/z es:

$$m/z = 2Vt^2/L^2$$

Dónde: V es el potencial de aceleración, t el tiempo de vuelo del ion en el analizador, y L la longitud del analizador. Si se mantienen constantes V y L, la relación m/z es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo, de allí el nombre de este analizador.

El poder de resolución (RP) se define como $RP = m/\Delta m$, donde m es el promedio de la masa exacta y Δm es la menor diferencia de las masas del pico a un 50 % de su altura. Usualmente el RP del TOF es superior a 10000, lo que le permite diferenciar interferentes que posean la misma masa nominal, también al tener picos más angostos (mayor altura de los picos), se mejora la relación señal/ruido.

La masa exacta se define mediante la siguiente ecuación:

$$\text{masa exacta (ppm)} = \left(\frac{m/z_{\text{experimental}} - m/z_{\text{teórico}}}{m/z_{\text{teórico}}} \right) * 10^6$$

En general, un valor de masa medido para ser considerado masa exacta debe ser menor a 5 ppm, los analizadores TOF en la actualidad vienen con especificación de masa exacta menores a 2 ppm. La masa exacta permite determinar la composición elemental con alta confiabilidad, distinguir entre componentes isobáricos y mejorar la especificidad de detección en los análisis ms/ms.

2.2.6. Caracterización química de lípidos

En la actualidad, el desarrollo de modernas técnicas analíticas como la espectrometría de masas permiten determinar el número y la especie química de cualquier clase de lípido presente en la muestra, lo que se conoce como “lipidómica”²¹. Pero no es la única herramienta, la figura 12 (Anexo) muestra una imagen de las herramientas analíticas más usadas en la actualidad en el análisis de lípidos.

Una estrategia para identificar los lípidos implica comparar los espectros de masas experimentales con espectros MS/MS generados *in-silico*²², cuyo procedimiento se muestra en la figura 13 (Anexo). Lo más resaltante de esta figura es que el método aprovecha las estructuras en común de las clases de lípidos para generar las relaciones m/z más probables de los fragmentos en base a tres partes: grupo funcional, linker y scaffold. Por ejemplo, en el caso del lípido monogalactosil diacilglicerol (MGDG) al analizarlo en un UHPLC-QTOF en modo ESI negativo, se esperan dos fragmentos que serían formados por el linker y el scaffold: $[M-FA_1-FA_2+H_2O-H]^-$ m/z 235.0824 y $[M-FA_1-FA_2+2H_2O-H]^-$ m/z 253.0928, a parte del ion molecular $[M+HCO_2]^-$ y los fragmentos de ácidos grasos $[R_1COO]^-$ y $[R_2COO]^-$ cuyas relaciones m/z dependen de la masa molecular de los ácidos grasos. En modo ESI positivo, se esperan obtener el ion molecular $[M+NH_4]^+$ y el fragmento $[M-C_6H_{10}O_5+H]^+$ obtenido al perder el scaffold $C_6H_{10}O_5$. La tabla 2 muestra las relaciones m/z de algunos fragmentos de interés para identificar las clases de lípidos polares más comunes, en el mismo sentido la tabla 3 muestra las relaciones m/z de los fragmentos de ácidos grasos más comunes de las clases de lípidos.

Tabla 2. Relaciones m/z de fragmentos más comunes en las clases de lípidos polares.

Clase de lípido	Fragmento	m/z
DGDG	$[C_{15}H_{23}O_{11}]^-$	379,1246
MGDG	$[C_9H_{15}O_7]^-$	235,0824
SQDG	$[C_6H_9O_7S]^-$	225,0069
PG	$[C_3H_6O_5P]^-$	152,99586
PI	$[C_6H_{10}O_8P]^-$	241,01132
PE	$[C_2H_7NO_4P]^-$	140,01128
DGTS	$[C_{10}H_{22}NO_5]^+$	236,14924

Tabla 3. Relaciones m/z de los fragmentos de ácidos grasos más comunes.

Ácido graso	$[M-H]^-$
14:0	227,2021
15:0	241,2155
16:0	255,23295
16:1	253,21735
16:2	251,20165
16:3	249,18605

Ácido graso	[M-H] ⁻
16:4	247,17035
16:5	245,15475
17:0	269,24855
18:0	283,26425
18:1	281,24855
18:2	279,23295
18:3	277,2172
18:4	275,20165
18:5	273,18605
19:0	297,27995
19:1	295,26425
20:0	311,29555
20:1	309,27995
20:2	307,26425
20:3	305,24855
20:4	303,23295
20:5	301,21735
20:6	299,20165
21:0	325,31125
22:0	339,32685
22:1	337,31125
22:2	335,29555
22:3	333,27995
22:4	331,26425
22:5	329,24855
22:6	327,23295
22:7	325,21735

2.2.7. Biocomercio

El Perú ratificó en el año 2014 el protocolo de Nagoya que tiene como objetivo la participación justa y equitativa en los beneficios que se derivan de la utilización de los recursos genéticos, contribuyendo por ende a la conservación de la diversidad biológica y a la utilización sostenible de sus componentes.

El compromiso del Perú para el cumplimiento de este protocolo se plasma en la *Estrategia Nacional de Biocomercio y su Plan de Acción al 2025* del MINCETUR²³, de donde se puede extraer el concepto de Biocomercio: “Aquellas actividades de recolección, producción, transformación y comercialización de bienes y servicios derivados de la biodiversidad nativa

(recursos genéticos, especies y ecosistemas) que involucran prácticas de conservación y uso sostenible, y son generados con criterios de sostenibilidad ambiental, social y económica”.

Además, se identifican los principios y criterios del biocomercio (tabla 4) y los ejes temáticos de la estrategia nacional de biocomercio 2015-2025:

- (1) Políticas y marco normativo para la promoción e implementación del biocomercio.
- (2) Institucionalidad relacionada al Biocomercio.
- (3) Desarrollo de la oferta.
- (4) *Investigación, desarrollo e innovación.*
- (5) Desarrollo de Mercados.
- (6) Gestión del conocimiento.
- (7) Monitoreo y evaluación.

En particular, el eje temático de *Investigación, desarrollo e innovación*, es de importancia crítica para la estrategia y trata sobre la generación de conocimiento científico, sus usos, características y propiedades de los bienes y servicios de la biodiversidad, así como el desarrollo de tecnologías para su uso sostenible y a la participación en conjunto con los centros de investigación y la empresa privada para el desarrollo y fortalecimiento de productos innovadores.

Tabla 4. Principios y criterios del biocomercio.

Principios	Criterios
1. Conservación de la Biodiversidad	<p>1.1 Mantenimiento de las características de los ecosistemas y hábitats naturales de las especies aprovechadas.</p> <p>1.2 Mantenimiento de variabilidad genética de flora, fauna y microorganismos (para uso y conservación).</p> <p>1.3 Mantenimiento de los procesos ecológicos</p> <p>1.4 Las actividades deben enmarcarse en planes de manejo, sean en áreas protegidas o no, en coordinación con las autoridades competentes y actores involucrados</p>
2. Uso sostenible de la Biodiversidad	<p>2.1 La utilización de la biodiversidad debería basarse en un documento de gestión sostenible, que incluya elementos como una tasa de aprovechamiento menor a la tasa de regeneración, sistemas de monitoreo (estado poblacional) e índices de rendimiento</p> <p>2.2 El aprovechamiento de la agrobiodiversidad debería incluir prácticas agrícolas que contribuyan a la conservación de la biodiversidad</p>

Principios	Criterios
	2.3 Cumplimiento de estándares técnicos para el desarrollo de iniciativas de servicios ambientales
	2.4 Generación de información y documentación de las experiencias de la organización como aporte al conocimiento sobre la biodiversidad
3. Distribución justa y equitativa de los beneficios derivados del uso de la Biodiversidad	3.1 Interacción e inclusión en el marco de las actividades de Biocomercio de la mayor cantidad posible de los actores de la cadena de valor
	3.2 La generación de valor debe tener lugar a lo largo de la cadena, bajo condiciones de transparencia, aportando así todos los actores al posicionamiento de productos de valor agregado en los mercados
	3.3 Información y conocimiento de los mercados
4. Sostenibilidad Socio-Económica	4.1 Existencia de potencial de mercados
	4.2 Rentabilidad financiera
	4.3 Generación de empleo y mejora de calidad de vida
	4.4 Prevención de eventuales impactos negativos sobre prácticas productivas y culturales locales que puedan, por ejemplo afectar la diversificación y la seguridad alimentaria
	4.5 Capacidad organizativa y de gestión
5. Cumplimiento de la legislación nacional e internacional	5.1 Conocimiento y cumplimiento de la legislación nacional y local aplicable para el uso de la biodiversidad y el comercio de sus productos y servicios derivados (manejo de vida silvestre, legislación laboral, fitosanitaria, comercial, estudio de impacto ambiental, etc.).
	5.2 Conocimiento y cumplimiento de legislación internacional aplicable para el uso de la biodiversidad y el comercio de sus productos y servicios derivados
6. Respeto de los derechos de los actores involucrados	6.1 Respeto a los derechos humanos, generacionales y de género
	6.2 Respeto a los derechos de propiedad intelectual
	6.3 Respeto a los derechos de comunidades locales y pueblos indígenas (territorio, cultura, conocimiento, prácticas)
	6.4 Mantenimiento y rescate de conocimientos y prácticas tradicionales.
	6.5 Seguridad laboral y adecuadas condiciones de trabajo
7. Claridad sobre la tenencia de la tierra, el uso y acceso a los recursos y a los conocimientos	7.1 Tenencia de la tierra de acuerdo con la normativa correspondiente
	7.2 El acceso a los recursos biológicos y genéticos para su uso sostenible con consentimiento informado previo y con base a condiciones mutuamente acordadas
	7.3 El acceso al conocimiento tradicional se realiza con consentimiento informado previo

De otro lado, el concepto de biocomercio presenta tres enfoques: Enfoque de cadena de valor, enfoque de manejo adaptativo y enfoque ecosistémico. Se trata de integrar los aspectos sociales y ecológicos con los procesos productivos, con el objetivo de cumplir las responsabilidades sociales y ambientales, garantizando el menor impacto en las especies y ecosistemas y logrando el mejoramiento continuo de las practicas productivas sin dejar de lado el uso sostenible, la conservación de la biodiversidad y la distribución equitativa de

los beneficios ambientales, sociales y económicos entre los participantes de la cadena.

2.2.8. Mercado de las microalgas

De acuerdo con un informe de mercado publicado en el año 2018 por Credence Research²⁴, se espera que el mercado de los productos de las algas alcance los US \$ 53.43 billones en el 2026, expandiéndose a una CAGR (Tasa de Crecimiento Anual Compuesto) de más de 5.8% desde el 2017 hasta el 2026. Por ejemplo, se espera que el mercado mundial de la microalga *Spirulina* sp. registre una CAGR del 10% durante el período de pronóstico y se estima que tendrá un valor de casi US \$ 2000 millones para 2026, debido a factores como la mayor aplicación de *Spirulina platensis* en cosméticos o la aprobación reciente de la ficocianina como color azul natural para los alimentos²⁵. Otro ejemplo es el mercado de ingredientes de la microalga *Chlorella* sp. que está preparado para registrar una CAGR de 25.4%, para llegar a los US \$ 700 millones el 2022. Además, existen otras microalgas que pueden ser una fuente alternativa de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que tradicionalmente se han obtenido del pescado o se han extraído del aceite de pescado, el tamaño del mercado de ingredientes EPA/DHA a partir de la aplicación de suplementos dietéticos podría superar las 60 000 toneladas el 2022²⁶.

2.2.9. Diseño de experimentos

El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) de Estados Unidos de América define al diseño de experimentos (DOE) como una aproximación sistemática y rigurosa para la resolución de problemas que aplica los principios y técnicas en la etapa de recopilación de datos para garantizar la generación de conclusiones validas, defendibles y sustentables, considerando la menor inversión en número de experimentos, tiempo y dinero²⁷.

El diseño de experimentos se selecciona de acuerdo al objetivo de la investigación, existen cinco objetivos en el que el DOE puede ser aplicado:

- (1) Objetivo de comparación. Si se desea determinar el efecto de un factor, seleccionado a-priori, sobre un proceso, independientemente de otros factores.
- (2) Objetivo de screening. Si se desea determinar el efecto de todos o la mayoría de factores de un proceso para seleccionar los factores con mayor efecto.
- (3) Objetivo de optimización. Si se desea determinar los niveles de los factores que optimizan la respuesta de un proceso.
- (4) Objetivo de optimización de mezclas. Si se desea determinar la mezcla óptima cuando los factores son proporciones de una mezcla.
- (5) Objetivo de modelado. Si se desea determinar la mejor función matemática que explica el fenómeno en estudio.

La elección del DOE dependerá del presupuesto y del nivel de significancia (error tipo I y II) que se establece para el estudio.

La tabla 5, muestra algunos diseños recomendables de acuerdo al número de factores y al objetivo de la investigación.

Tabla 5. Selección del diseño de experimentos.

Número de factores	Objetivo comparativo	Objetivo de screening	Objetivo de optimización
1	Diseño de un factor completamente aleatorizado	-	-
2-4	Diseño de bloques aleatorizado	<i>Diseño factorial completo</i> o factorial fraccionado	Diseño Central compuesto o <i>Diseño de Box-Behnken</i>
Más de 5	Diseño de bloques aleatorizado	Diseño factorial fraccionado o Diseño de Plackett-Burman	Se realiza el diseño de screening para reducir el número de factores

2.2.10. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales fue descrito por primera vez por Pearson en 1901 y desde ese momento esta técnica es utilizada para reducir el mayor número posible de variables. Las componentes principales son un conjunto de nuevas variables que no tienen correlación entre sí, estas son combinaciones lineales de las variables anteriores y se van construyendo de acuerdo al nivel de la variabilidad total requerida de la muestra. Los componentes así obtenidos permiten interpretar relaciones ocultas entre estas variables. El objetivo de esta técnica es identificar las combinaciones lineales que mejor representan a las variables iniciales X_1, X_2, \dots, X_p , por un nuevo grupo de variables C_1, C_2, \dots, C_n , donde $n < p$, para ello se debe optimizar la siguiente ecuación para lograr el n mínimo.

$$C_i = \sum_{j=1}^p a_{ji} X_j$$

Los valores $a_{1i}, a_{2i}, \dots, a_{pi}$ son las constantes de las componentes principales. Antes de determinar los componentes se debe estandarizar los datos para tener una media igual a cero y una desviación estándar igual a 1.

Esta técnica es muy utilizada en quimio-taxonomía para clasificar e identificar los organismos, generalmente plantas, de acuerdo a sus diferencias y similitudes en la composición bioquímica. Estos compuestos se conocen como marcadores quimio-taxonómicos. La mayoría de compuestos que se estudian son los metabolitos primarios y secundarios.

2.2.11. Glosario

ARA: ácido araquidónico.

Aducto: producto de la adición directa de dos o más moléculas distintas, resultando un producto de reacción que contiene todos los átomos de sus componentes.

APCI: ionización química a presión atmosférica.

BEAM: Biotechnological and Environmental Applications of Microalgae – Murdoch University.

DGTS: diacilgliceril-*N,N,N*-trimetilhomoserina.

EPA: ácido eicosapentaenoico.

ESI: ionización por electrospray.

DHA: ácido docosahexaenoico.

FA: ácido graso, fatty acid en inglés.

Fondecyt: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de flama.

IIAP: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.

IMARPE: Instituto del Mar del Perú.

In-silico: producido por modelos computacionales.

MGDG: monogalactosil diacilglicerol.

MGMG: monogalactosil monoacilglicerol.

MINCETUR: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.

Nativo: Perteneciente o relativo al país o lugar natal.

PCA: Análisis de Componentes Principales.

PUFA: ácido graso poliinsaturado.

UHPLC-ESI-QTOF: equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a un detector de espectrometría de masas cuadrupolo y tiempo de vuelo.

TLC: cromatografía en capa fina.

3.1. Reactivos

Acetonitrilo grado LC-MS Honeywell Riedel-de Haën™, 2-propanol grado LC-MS J. T. Baker, ácido fórmico 98-100 % grado LC-MS Merck, amoníaco 25 % grado PA Merck, metanol grado LC-MS Merck, agua grado LC-MS Merck, acetato de leucina encefalina Sigma-Aldrich®, solución de formiato de sodio 0,5 mM, cloroformo grado PA J. T. Baker, diclorometano grado PA Merck y cloruro de potasio grado PA Scharlau.

3.2. Equipos

Cromatógrafo líquido acoplado al detector de masas cuadrupolo y tiempo de vuelo (Waters Xevo G2-XS QTOF), balanza analítica Sartorius MSU225S-000-DU, centrífuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5702R, evaporador GlassCol 099A-EV2024S, baño de ultrasonido Branson 2510 y campana extractora de gases LABCONCO.

3.3. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales

El método estadístico utilizado para la optimización fue el diseño de superficies de Box Behnken aleatorizado para tres factores con dos réplicas. Se optimizó la variable respuesta *porcentaje de lípidos totales* (%Lip) con los siguientes factores, *masa de la muestra* (w), *composición del solvente de extracción* (S) y *tiempo del baño de ultrasonido* (t). Los niveles de los factores se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Factores y niveles del diseño de superficies.

w (mg)	S (cloroformo/metanol)	t (min)
25 (-1)	1:2 (-1)	10 (-1)
50 (0)	1,5:1,5 (0)	20 (0)
75 (+1)	2,1 (+1)	30 (+1)

w: masa de la muestra, S: composición del solvente de extracción y t: tiempo del baño de ultrasonido.

Las muestras de microalgas liofilizadas fueron producidas por el Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos – IMARPE. En total se optimizó este proceso para dos microalgas, *Nannochloropsis oceanica* (Np) código IMP-BG-Np y *Desmodesmus asymmetricus* (Des) código IMP-BG-249, para determinar si existe alguna diferencia en los valores de los factores optimizados de una microalga marina y una microalga dulceacuícola respectivamente.

El método analítico a optimizar fue el método de Folch, *et al.*²⁸ con algunas modificaciones, de modo general se pesó *w* miligramos de la microalga liofilizada y se extrajeron los lípidos con 3 mL de la mezcla de solventes cloroformo/metanol *S*. Se utilizó el baño de ultrasonido para mejorar la extracción por *t* minutos, la extracción se realizó dos veces. La fase de cloroformo/lípidos fue separada con 2,1 mL de cloruro de potasio 0,88% y evaporada con nitrógeno gas para obtener el extracto de lípidos seco, se almacenaron en vacío y oscuridad durante 14 horas para asegurar la completa sequedad, luego fueron pesados para obtener el *porcentaje de lípidos totales* mediante la siguiente fórmula:

$$\%Lip = \frac{w_T}{w} * 100\%$$

Dónde: W_T = masa de los lípidos totales extraídos. El detalle de la técnica analítica de extracción de lípidos se muestra en el flujograma de la figura 7 (Anexo).

3.4. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares

El método estadístico utilizado para la evaluación de los efectos fue el diseño factorial completo aleatorizado para tres factores con dos réplicas. Se evaluaron dos variables respuestas: el *área relativa del ion molecular* (A_{rel}) y el *tiempo de retención del ion molecular* (TR) con los siguientes factores, *pH de la fase móvil* (*pH*), *modo de ionización* (*ESI*) y *energía de colisión* (*CE*). El *área relativa del ion molecular* se calculó con la siguiente fórmula:

$$A_{rel\ ij} = \frac{A_{ij}}{A_{imax}} * 100\%$$

Dónde: A_{ij} = Área del ion molecular del tratamiento j del lípido i, y A_{imax} = Área del ion molecular máxima de los tratamientos del lípido i.

Los niveles de los factores se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Factores y niveles del diseño factorial completo.

pH	ESI	CE
ácido 4-6 (-1)	ESI - (-1)	0 V (-1)
básico 7-9 (+1)	ESI + (+1)	20-40 V (+1)

pH: pH de la fase móvil, ESI: modo de ionización y CE: energía de colisión.

Los lípidos extraídos para las microalgas *Np* y *Des* mediante el método optimizado de extracción de lípidos totales fueron fraccionados mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) con el cartucho HyperSep C18 200 mg. Se acondicionaron los cartuchos con 3 mL de diclorometano, metanol y agua respectivamente. Se cargaron los cartuchos con el extracto de lípidos y se fraccionaron con 3 mL de agua, metanol/agua 1:1, metanol y diclorometano/metanol 1:1, obteniéndose las fracciones F1, F2, F3 y F4 respectivamente. Las fracciones acuosas F1 y F2 fueron secadas en una estufa de vacío a 60 °C durante 14 horas, las fracciones orgánicas F3 y F4 fueron secadas con nitrógeno gas para determinar el *porcentaje de la fracción lipídica* (%F) mediante la siguiente fórmula:

$$\%F = \frac{W_F}{W} * 100\%$$

Dónde: W_F = masa de los lípidos de la fracción en mg.

Los lípidos polares presentes en la fracción F3 fueron disueltos con 2 mL de 2-propanol/acetonitrilo/agua 2:1:1 y analizados por espectrometría de masas bajo las condiciones propuestas por Isaac, *et al.*²⁹ con algunas modificaciones: Columna Waters Acquity UPLC BEH C18 2,1 mmx150 mm, 1,7 μ m a una temperatura de 55 °C y un flujo de 0,2 mL/min, con la fase móvil A: *acetonitrilo/agua 60:40 con 10 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido fórmico* y fase móvil B: *2-propanol/acetonitrilo 90:10 con 10 mM de formiato de amonio y 0.1% de ácido fórmico*, la gradiente de la fase móvil fue 0-2 min, 40-43% (B); 2-2,1 min, 43-50% (B); 2,1-12 min, 50-54% (B); 12-12,1 min, 54-70% (B); 12,1-18 min, 70-99% (B); 18-20 min, 99-40% (B) y 20-23 min, 40% (B). Se utilizaron los modos de ionización

ESI (+) y ESI (-) en un rango de masa de 100 a 1200 m/z (calibrado con Formiato de Sodio 0,5 mM). Los parámetros de la fuente de ionización fueron: voltaje capilar 2 kV ESI (+) y 1 kV ESI (-), el voltaje del cono fue 30 V, la temperatura de la fuente fue 120 °C, la temperatura de desolvatación fue 550 °C, el flujo de gas de desolvatación fue 900 L/h y el modo de adquisición de los datos fue MS^E con energías de colisión de baja energía de 0 V y alta energía de 20-40 V. Se utilizó acetato de leucina encefalina 300 ppb para la corrección de la masa, 556,2771 m/z para ESI (+) y 554,2615 m/z para ESI (-). Las masas exactas obtenidas fueron comparadas con las bases de datos de LipidMatch, Lipid Maps, ChemSpider y PubChem para identificar los lípidos. No se hizo distinción en las posiciones sn-1 y sn-2 de los ácidos grasos identificados.

3.5. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas

Se seleccionaron 22 microalgas, aleatorizadas con el software Minitab 16, de un total de 475 microalgas nativas mantenidas en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del IMARPE (Tabla 8).

Tabla 8. Microalgas seleccionadas para el screening de lípidos polares

Phylum	Especie	Abreviatura propuesta	Código
<i>Bacillariophyta</i>	<i>Asterionella</i> sp.	Ast	IMP-BG-257
	<i>Licmophora</i> sp.	Lic	IMP-BG-462
	<i>Pleurosigma</i> sp.	Ple	IMP-BG-458
	<i>Tabellaria fenestrata</i>	Tab	IMP-BG-480
	<i>Thalassiosira</i> sp.	Tha	IMP-BG-463
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	Ank	IMP-BG-484
	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	Ank	IMP-BG-345
	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i>	Coe	IMP-BG-488
	<i>Comasiella arcuata</i>	Com	IMP-BG-302
	<i>Desmodesmus armatus</i>	Des	IMP-BG-245
	<i>Dictyosphaerium</i> sp.	Dic	IMP-BG-189
	<i>Dunnaliella salina</i>	Dun	IMP-BG-002
	<i>Dunnaliella salina</i>	Dun	IMP-BG-072
	<i>Radiococcus</i> sp.	Rad	IMP-BG-117
<i>Cyanophyta</i>	<i>Arthrospira platensis</i>	Art	IMP-BG-027
	<i>Arthrospira platensis</i>	Art	IMP-BG-028
	<i>Calothrix</i> sp.	Cal	T027
	<i>Calothrix</i> sp.	Cal	T029

Phylum	Especie	Abreviatura propuesta	Código
	<i>Microchaete</i> sp.	Mic	T060
	<i>Nostoc</i> sp.	Nos	T026
	<i>Scytonema</i> sp.	Scy	T063
	<i>Trichormus</i> sp.	Tri	T020

Las muestras de cultivo de microalgas fueron producidas en volúmenes de 125 mL por el Banco de Germoplasma. Se centrifugaron 50 mL de los cultivos a 3500 rpm, 4°C y 20 min, se retiraron los sobrenadantes y se utilizaron la metodología de extracción de lípidos totales optimizada y metodología de identificación de lípidos polares por espectrometría de masas estudiada para identificar el número y clases de lípidos polares de las microalgas.

Las fórmulas para calcular el contenido de lípidos (Lip) y la fracción de lípidos polares (F3) en las muestras de cultivo respectivamente fueron las siguientes:

$$Lip (\mu\text{g/mL}) = 1000 * \frac{w_T}{V}$$

$$F3(\mu\text{g/mL}) = 1000 * \frac{w_{F3}}{V}$$

Dónde: V es el volumen de cultivo centrifugado en mL.

3.6. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados

El análisis de componentes principales de los lípidos polares identificados en el ítem anterior fue realizado seleccionando los lípidos polares más recurrentes de todos los Phylum estudiados y los análisis estadísticos se realizaron en el software RStudio Versión 1.2.5001.

El potencial económico de los lípidos polares fue investigado en la base de datos de patentes de Lens³⁰ utilizando las palabras claves: microalgae, polar lipid, glycolipid, MGDG, DGDG, SQDG, betain lipid, DGTS y ceramide.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales

Los resultados promedio del diseño de superficies de Box Behnken se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Diseño de superficies de Box Behnken y resultados del porcentaje de lípidos (%Lip) de las microalgas *Np* y *Des*.

Tratamiento	w	S	t	%Lip Np	%Lip Des
1	25	1:2	20	43,88	10,33
2	75	1:2	20	40,72	9,33
3	25	2:1	20	44,26	9,67
4	75	2:1	20	43,91	8,92
5	25	1,5:1,5	10	45,39	10,43
6	75	1,5:1,5	10	43,64	9,66
7	25	1,5:1,5	30	44,36	11,39
8	75	1,5:1,5	30	44,08	10,16
9	50	1:2	10	42,39	10,30
10	50	2:1	10	43,37	8,03
11	50	1:2	30	41,39	9,98
12	50	2:1	30	44,54	9,83
13	50	1,5:1,5	20	44,29	10,19
14	50	1,5:1,5	20	43,65	10,52
15	50	1,5:1,5	20	44,44	10,55

w: masa de la muestra, S: composición del solvente de extracción y t: tiempo del baño de ultrasonido.

Las tablas 10 y 11 muestran que la falta de ajuste del análisis de varianza (ANOVA) y los valores de coeficientes de determinación (R^2) para los modelos de regresión de variables codificadas propuestas (1) y (2), describen adecuadamente la relación funcional entre los factores experimentales y la variable respuesta, $p\text{-valor} > \alpha = 0,05$ y $R^2 > 70\%$, respectivamente.

$$\% \text{ Lip Np} = 44,27 - 0,69w + 0,93S - 0,08t + 0,70wS + 0,59St - 1,18S^2, R^2 = 83,08\% \quad \dots(1)$$

$$\% \text{ Lip Des} = 10,41 - 0,47w - 0,43S + 0,37t + 0,52St - 0,86S^2, R^2 = 71,01\% \quad \dots(2)$$

De otro lado, los efectos de los términos cuadráticos fueron significativos solo en el caso de la *composición del solvente de extracción* ($p\text{-valor} < \alpha = 0,05$). La gráfica del *porcentaje de lípidos vs masa de la muestra y composición del solvente de extracción* (Fig. 1), muestra esta tendencia cuadrática en la superficie debido a la curvatura

formada por los niveles del factor *composición del solvente* para ambas microalgas analizadas. Los efectos de las interacciones y términos lineales también fueron significativos ($p\text{-valor} < \alpha = 0,05$), excepto para la interacción entre la *masa de la muestra* y *tiempo del baño de ultrasonido*.

Tabla 10. ANOVA del diseño de superficies de la microalga *Np*.

Fuente	gl	SC Sec	SC Ajust	CM Ajust	F	P valor
Regresión	6	38,27	38,27	6,38	18,01	0,000
Lineal	3	21,05	20,83	6,94	19,60	0,000
w	1	7,68	7,68	7,68	21,69	0,000
S	1	13,28	12,78	12,78	36,09	0,000
t	1	0,08	0,09	0,09	0,26	0,615
Cuadrado	1	10,86	10,01	10,01	28,25	0,000
S*S	1	10,86	10,01	10,01	28,25	0,000
interacción	2	6,36	6,36	3,18	8,97	0,001
w*S	1	3,96	3,96	3,96	11,18	0,003
S*t	1	2,40	2,40	2,40	6,76	0,016
Error residual	22	7,79	7,79	0,35		
Falta de ajuste	6	2,22	2,22	0,37	1,06	0,424
Error puro	16	5,57	5,57	0,35		
Total	28	46,07				

w: masa de la muestra, S: composición del solvente de extracción, t: tiempo del baño de ultrasonido, gl: grados de libertad, SC Sec: suma de cuadrados secuenciales, SC Ajust: suma de cuadrados ajustados, CM Ajust: Cuadrado medio ajustado y F: estadístico F.

Tabla 11. ANOVA del diseño de superficies de la microalga *Des*

Fuente	gl	SC Sec	SC Ajust	CM Ajust	F	P valor
Regresión	5	16,52	16,52	3,30	11,76	0,000
Lineal	3	8,71	8,71	2,90	10,34	0,000
w	1	3,53	3,53	3,53	12,56	0,002
S	1	3,02	3,02	3,02	10,75	0,003
t	1	2,16	2,16	2,16	7,70	0,011
Cuadrado	1	5,56	5,56	5,56	19,79	0,000
S*S	1	5,56	5,56	5,56	19,79	0,000
interacción	1	2,24	2,24	2,24	7,98	0,009
S*t	1	2,24	2,24	2,24	7,98	0,009
Error residual	24	6,74	6,75	0,28		
Falta de ajuste	7	0,61	0,61	0,09	0,24	0,968
Error puro	17	6,13	6,13	0,36		
Total	29	23,27				

w: masa de la muestra, S: composición del solvente de extracción, t: tiempo del baño de ultrasonido, gl: grados de libertad, SC Sec: suma de cuadrados secuenciales, SC Ajust: suma de cuadrados ajustados, CM Ajust: Cuadrado medio ajustado y F: estadístico F.

Al maximizar el modelo de regresión se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción de lípidos para las microalgas *Np* y *Des*, valores mostrados en la tabla 12:

Tabla 12. Condiciones óptimas de los factores del diseño de superficies.

Microalga	w (mg)	S (cloroformo:metanol)	t (min)
<i>Np</i>	25	0,9:1,1	10
<i>Des</i>	25	1,0:1,0	30

w: masa de la muestra, S: composición del solvente de extracción y t: tiempo del baño de ultrasonido.

Para validar las condiciones óptimas de los modelos de regresión (1) y (2), se compararon los porcentajes de lípidos totales de la tabla 13. Se comprobó que las condiciones óptimas del modelo producen porcentajes de lípidos superiores a cualquier valor de la tabla 9 y en este caso se obtuvo una diferencia de 2 a 4%, para las microalgas *Np* y *Des* respectivamente, a favor del resultado experimental.

Tabla 13. Comparación del %Lip max Exp versus %Lip max Pred.

Microalga	%Lip max Exp	%Lip max Pred	%Lip max Exp - %Lip max Pred
<i>Np</i>	47,38	45,07	2,31
<i>Des</i>	15,36	11,25	4,11

%Lip max Exp: Porcentaje de lípidos totales obtenidos en un nuevo experimento con las condiciones óptimas y %Lip max Pred: Porcentaje de lípidos totales obtenidos de los modelos de regresión (1) y (2) con las condiciones óptimas.

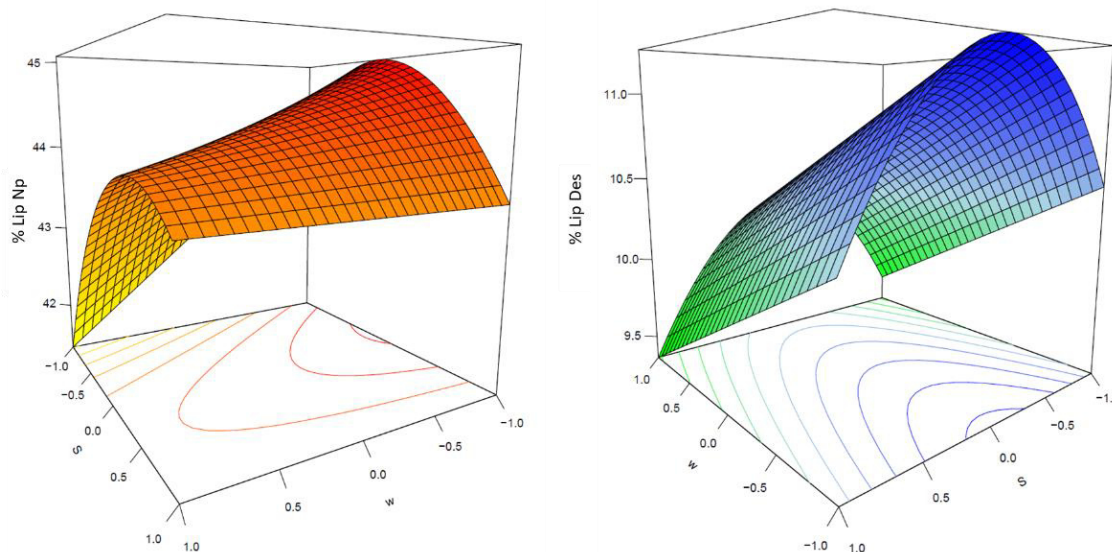


Figura 1. Gráfica de superficies del %Lip vs w, S, t = 10 min (Izquierda: *Np*, Derecha: *Des*)

4.2. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares

La tabla 14 muestra que los porcentajes de lípidos neutros (%F4) fueron mayores que los lípidos polares (%F3) para ambas microalgas. La tabla 15 muestra el perfil de lípidos polares identificados, correspondientes a la fracción F3, de las microalgas *Np* y *Des*.

Tabla 14. Porcentaje promedio de las fracciones lipídicas (%F).

Microalga	Fracción	%F
Np	F1	11,40
	F2	1,75
	F3	3,62
	F4	37,34
Des	F1	2,06
	F2	2,14
	F3	2,30
	F4	9,46

Tabla 15. Lípidos polares identificados, en modo ESI (-), microalgas Np (Izquierda) y Des (Derecha).

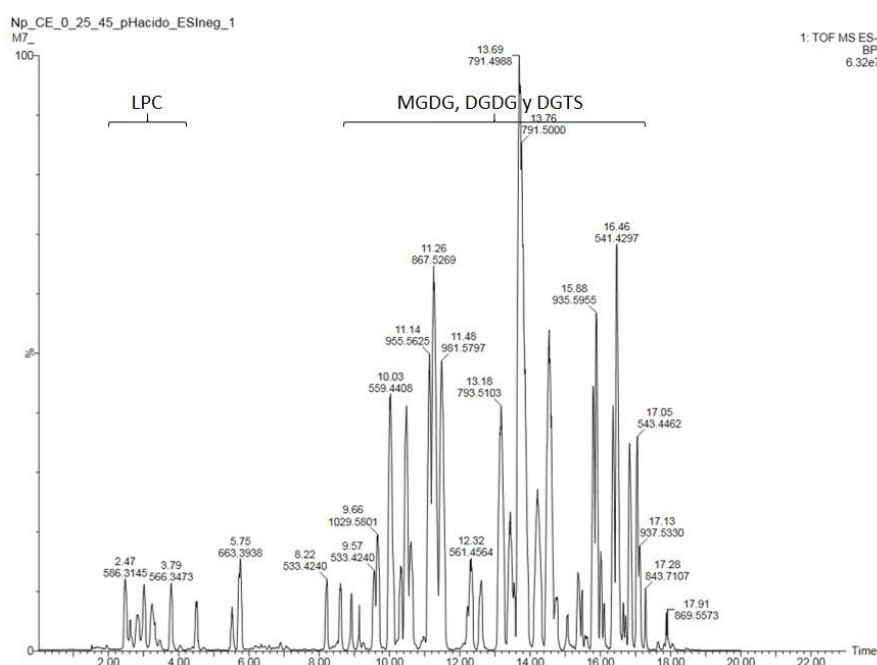
N	Lípido	TR (min)	m/z	N	Lípido	TR (min)	m/z
1	LPC(20:5)	2,46	586,3142	1	MGMG(16:4)	2,19	529,2653
2	LPC(18:3)	2,62	562,3144	2	MGMG(18:3)	3,03	559,3120
3	LPC(16:1)	2,77	538,3156	3	SQDG(34:6)	7,07	809,4515
4	LPC(18:3)	2,79	562,3154	4	SQDG(36:7)	7,60	835,4667
5	LPC(16:1)	2,95	538,3164	5	DGDG(18:3/16:4)	7,83	951,5312
6	LPC(18:2)	3,05	564,3309	6	DGDG(18:3/16:3)	8,55	953,5482
7	LPC(18:2)	3,20	564,3295	7	SQDG(36:6)	8,60	837,4808
8	LPC(18:1)	3,80	566,3473	8	MGDG(18:3/16:4)	9,15	789,4779
9	LPC(18:2)	4,05	566,3470	9	DGDG(18:3/18:4)	9,27	979,5626
10	DGDG(20:5/12:0)	8,56	927,5317	10	MGDG(18:3/16:3)	9,99	791,4954
11	DGDG(20:5/14:1)	8,91	953,5491	11	DGDG(18:3/16:2)	10,19	955,5636
12	MGDG(18:3/16:4)	9,13	789,4775	12	SQDG(36:5)	10,23	839,4970
13	DGDG(20:5/20:5)	9,65	1029,5791	13	DGDG(18:3/18:3)	10,64	981,5798
14	MGDG(20:5/12:0)	10,08	765,4794	14	MGDG(18:3/16:3)	10,83	791,4948
15	DGDG(18:3/18:3)	10,61	981,5809	15	MGDG(18:3/18:4)	10,86	817,5098
16	DGTS(20:5/20:5)	10,62	848,5692	16	MGDG(18:3/16:3)	10,98	791,4938
17	SQDG(32:2)	10,97	789,4826	17	DGDG(18:3/18:3)	11,03	981,5787
18	DGDG(20:5/14:0)	11,14	955,5625	18	MGDG(18:3/16:2)	11,96	793,5109
19	MGDG(20:5/20:5)	11,26	867,5269	19	SQDG(34:3)	12,06	815,4975
20	DGDG(20:5/16:1)	11,47	981,5797	20	DGDG(18:3/16:1)	12,36	957,5781
21	DGDG(20:5/18:2)	12,12	1007,5959	21	MGDG(18:3/18:3)	12,47	819,5264
22	DGTS(20:5/14:0)	12,60	774,5517	22	DGDG(18:3/18:2)	12,76	983,5948
23	DGTS(20:5/20:4)	12,66	850,5825	23	PG(18:3/16:0)	13,24	743,4886
24	DGDG(20:5/16:0)	12,74	983,5955	24	SQDG(34:2)	14,50	817,5134
25	MGDG(20:5/14:0)	13,18	793,5109	25	MGDG(18:3/18:2)	15,00	821,5419
26	MGDG(20:5/20:4)	13,44	869,5422	26	DGDG(18:3/16:0)	15,19	959,5964
27	MGDG(20:5/16:1)	13,50	819,5276	27	DGDG(18:3/18:1)	15,29	985,6091
28	SQDG(32:1)	13,70	791,4987	28	SQDG(32:0)	15,81	793,5143
29	DGDG(16:1/16:1)	13,90	933,5812	29	SQDG(36:4)	15,86	819,5294
30	PI(16:1/16:0)	14,22	807,5027	30	DGDG(18:2/16:0)	16,01	961,6121
31	DGDG(20:5/16:0)	14,54	983,5950	31	PG(18:1/16:0)	16,21	747,5170
32	PC(20:5/16:0)	14,75	824,5456	32	SQDG(36:1)	16,55	847,5611
33	DGTS(20:4/14:0)	15,00	776,5674	33	DGDG(18:1/16:0)	16,68	963,6259
34	DGTS(20:4/20:4)	15,03	852,5986				
35	MGDG(20:4/20:4)	15,48	871,5576				
36	DGTS(20:5/16:0)	15,58	802,5831				
37	MGDG(20:5/16:0)	15,76	821,5414				
38	DGDG(16:1/16:0)	15,89	935,5946				
39	PI(18:1/16:0)	16,01	835,5340				
40	DGTS(16:0/16:1)	16,25	754,5882				
41	DGDG(16:0/18:1)	16,67	963,6277				

N: número de orden, TR: tiempo de retención y m/z: relación masa-carga.

Los lípidos identificados fueron el monogalactosil diacilglicerol (MGDG), digalactosil diacilglicerol (DGDG), sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG), monogalactosil monoglicérido (MGMG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), lisofosfatidilcolina (LPC) y diacilgliceril-*N,N,N*-trimetilhomoserina (DGTS).

El mayor número de lípidos polares para ambas microalgas fueron: los lípidos DGDG y MGDG. En el caso de la microalga *Np* abundaron los lípidos DGTS, LPC y PI mientras que en la microalga *Des* abundaron los lípidos SQDG, MGMG y PG. Otra diferencia que se pudo apreciar es que el ácido graso 20:5 es el más abundante en los lípidos polares de la microalga *Np* y el ácido graso 18:3 es el más abundante para la microalga *Des*.

Los cromatogramas típicos para ambas microalgas se muestran en las figura 2 y 3. Se pueden apreciar la intensidad de los picos cromatográficos de las clases de lípidos polares. Los espectros de masas de cada clase de lípido se muestran en la figura 15 (Anexo).



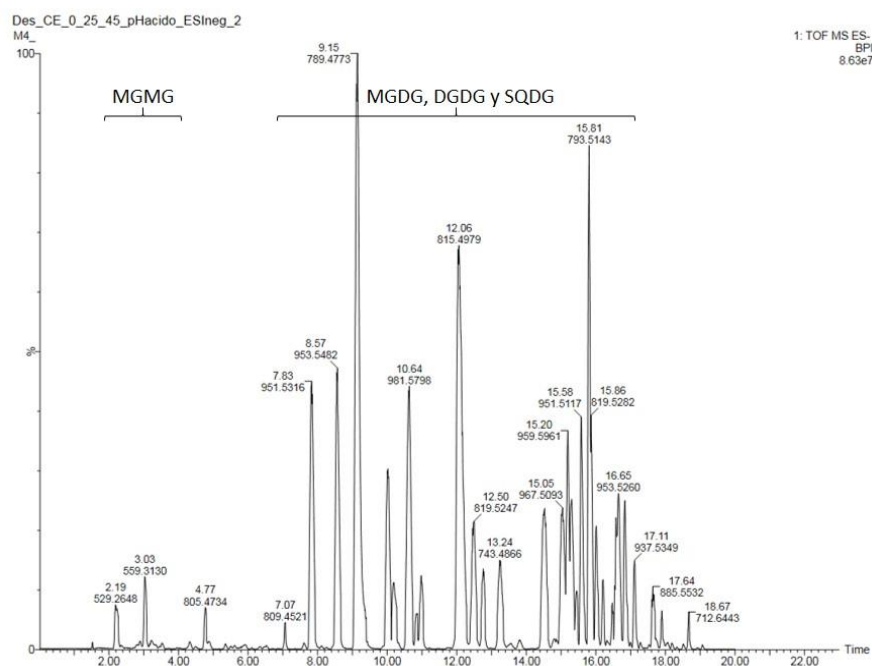


Figura 3. Cromatograma típico de la microalga *Des* en modo ESI (-).

Los efectos principales en el *área relativa* y el *tiempo de retención* del ion molecular de los lípidos más abundantes, obtenidos a partir del diseño factorial completo, se muestran en las tabla 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16. Efectos principales y p-valor del *área relativa* del ion molecular (A_{rel}) de los lípidos más intensos de cada clase de la fracción F3.

Clase de Lípido	Lípido	Efecto en el A_{rel} (%)		
		pH	ESI	CE
GL	MGMG(18:3)	-15,56 (0,028)	28,48 (0,001)	-53,11 (0,000)
	MGDG(20:5/20:5)	-9,43 (0,224)	22,72 (0,009)	-71,43 (0,000)
	MGDG(18:3/16:4)	-7,36 (0,110)	-4,86 (0,276)	-76,88 (0,000)
	DGDG(18:3/16:3)	-11,64 (0,052)	13,83 (0,025)	-75,45 (0,000)
	DGDG(20:5/16:0)	-14,30 (0,062)	18,36 (0,022)	-70,29 (0,000)
	SQDG(16:1/16:0)	-10,04 (0,305)	-43,21 (0,001)	-37,94 (0,002)
	SQDG(18:2/16:1)	-14,24 (0,090)	-49,59 (0,000)	-30,57 (0,002)
PL	LPC(18:1)	-3,98 (0,695)	34,03 (0,005)	-61,88 (0,000)
	PC(20:5/16:0)	-3,07 (0,805)	47,31 (0,002)	-46,18 (0,003)
	PI(16:1/16:0)	-9,78 (0,172)	-53,92 (0,000)	-24,15 (0,004)
	PG(18:3/16:0)	-4,47 (0,608)	-44,15 (0,000)	-37,46 (0,001)
BL	DGTS(20:5/20:5)	1,49 (0,773)	74,38 (0,000)	-22,23 (0,001)

GL: glicolípido, PL: fosfolípido, BL: lípido de betaína, pH: pH de la fase móvil, ESI: modo de ionización y CE: energía de colisión.

De acuerdo a los resultados, al incrementar la *energía de colisión* se reduce el *área relativa del ion molecular*, los lípidos MGMG, MGDG, DGDG, PC y LPC fueron

los más fragmentados reduciendo el área entre 46-77 % aproximadamente, mientras que los lípidos SQDG, DGTS, PI y PG fueron los menos fragmentados, 22-38%.

El *modo de ionización (ESI)* presentó efectos en el *área relativa del ion molecular* de acuerdo a la clase de lípidos. Para el caso de la clase GL, el modo ESI (+) incrementó el *área relativa del ion molecular* de los lípidos MGDG, MGMG y DGDG, mientras que en el modo ESI (-) incrementó del *área relativa del ion molecular* de los lípidos SQDG.

De otro lado, para la clase PL, el modo ESI (+) incrementó el *área relativa del ion molecular* de los lípidos LPC y PC, mientras que el modo ESI (-) incrementó el *área relativa del ion molecular* de los lípidos PI y PG. Para la clase BL, el modo ESI (+) incrementó el *área relativa del ion molecular* del lípido DGTS. Finalmente, de acuerdo a los resultados, en su mayoría el efecto del pH sobre el *área relativa del ion molecular* no fue significativo (p-valor > 0,05).

Tabla 17. Efectos principales y p-valor del tiempo de retención del ion molecular (TR) de los lípidos más intensos de cada clase de la fracción F3.

Clase de lípido	Lípido	Efecto en el TR (min)		
		pH	ESI	CE
GL	MGMG(18:3)	0,02 (0,036)	0,03 (0,022)	0,00 (1,000)
	MGDG(20:5/20:5)	0,36 (0,000)	-0,01 (0,221)	0,01 (0,221)
	MGDG(18:3/16:4)	0,26 (0,000)	0,02 (0,041)	-0,01 (0,460)
	DGDG(18:3/16:3)	0,22 (0,000)	0,02 (0,058)	0,00 (0,747)
	DGDG(20:5/16:0)	0,46 (0,000)	-0,02 (0,345)	-0,03 (0,055)
	SQDG(16:1/16:0)	-0,56 (0,000)	0,05 (0,007)	0,00 (0,873)
	SQDG(18:2/16:1)	-0,31 (0,000)	0,10 (0,001)	-0,01 (0,825)
PL	LPC(18:1)	0,08 (0,000)	0,00 (0,712)	-0,01 (0,083)
	PC(20:5/16:0)	0,45 (0,000)	-0,02 (0,000)	-0,01 (0,109)
	PI(16:1/16:0)	-0,49 (0,000)	0,05 (0,001)	0,01 (0,542)
	PG(18:3/16:0)	-0,30 (0,000)	0,10 (0,002)	-0,01 (0,734)
BL	DGTS(20:5/20:5)	0,38 (0,000)	0,02 (0,21)	-0,01 (0,628)

GL: glicolípido, PL: fosfolípido, BL: lípido de betaína, pH: pH de la fase móvil, ESI: modo de ionización y CE: energía de colisión.

El pH tuvo un efecto significativo en el *tiempo de retención* (p-valor < 0,05), el mayor efecto positivo fue para el DGDG(20:5/16:0) con 0,46 min y el mayor efecto negativo fue para el SQDG(16:1/16:0) con -0,56 min. Con respecto del efecto del ESI y CE, se puede apreciar que son de un orden de magnitud menor que el efecto del pH y por lo tanto no se consideran relevantes.

4.3. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas

La tabla 18 muestra que las microalgas del Phylum *Bacillariophyta* fueron las que obtuvieron las menores concentraciones de lípidos totales y lípidos polares. Las microalgas Coe-IMP-BG-488 y Des-IMP-BG-245 del Phylum *Chlorophyta* y las microalgas Art-IMP-BG-027 y Art-IMP-BG-028 del Phylum *Cyanophyta* obtuvieron la mayor cantidad de lípidos totales superando los 70 $\mu\text{g/mL}$. Las microalgas Ank-IMP-BG-345 y Des-IMP-BG-245 del Phylum *Chlorophyta* y las microalgas Art-IMP-BG-027 y Art-IMP-BG-028 del Phylum *Cyanophyta* obtuvieron la mayor cantidad de lípidos polares superando los 18 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 18. Concentración de lípidos totales (Lip) y lípidos polares (F3) en los cultivos de microalgas nativas.

Phylum	Especie	Lip ($\mu\text{g/mL}$)	F3 ($\mu\text{g/mL}$)	F3/Lip (%)
<i>Bacillariophyta</i>	Ast-IMP-BG-257	3,8	1,8	47,4
	Lic-IMP-BG-462	9,6	2,2	22,9
	Ple-IMP-BG-458	11,8	3,8	32,2
	Tab-IMP-BG-480	2,8	<0,2	<7,1
	Tha-IMP-BG-463	2,2	<0,2	<9,1
<i>Chlorophyta</i>	Ank-IMP-BG-345	51,0	18,4	36,1
	Ank-IMP-BG-484	46,2	12,4	26,8
	Coe-IMP-BG-488	72,4	7,6	10,5
	Com-IMP-BG-302	5,8	<0,2	<3,4
	Des-IMP-BG-245	95,4	20,0	21,0
	Dic-IMP-BG-189	32,6	9,8	30,1
	Dun-IMP-BG-002	10,2	6,8	66,7
	Dun-IMP-BG-072	30,4	16,6	54,6
	Rad-IMP-BG-117	4,0	<0,2	<5,0
<i>Cyanophyta</i>	Art-IMP-BG-027	79,2	33,0	41,7
	Art-IMP-BG-028	79,0	38,0	48,1
	Cal-T027	19,6	6,8	34,7
	Cal-T029	10,2	3,6	35,3
	Mic-T060	6,6	1,8	27,3
	Nos-T026	11,0	5,4	49,1
	Scy-T063	10,2	4,2	41,2
	Tri-T020	17,0	8,8	51,8

La tabla 19 muestra que los lípidos más abundantes para todos los Phylum fueron los GL: MGDG, DGDG y SQDG. Los PG estuvieron presentes en mayor número en el Phylum *Cyanophyta*. Los lípidos DGTS y Cer estuvieron únicamente presentes en el Phylum *Chlorophyta*. Las microalgas con mayor número de lípidos identificados

fueron Ank-IMP-BG-484 y Des-IMP-BG-245, superando los 47 lípidos polares, ambos del Phylum *Chlorophyta*.

Tabla 19. Número de lípidos identificados en las microalgas nativas.

Phylum	Especie	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	SQDG	PG	PI	DGTS	Cer_AP	Cer_NP	Total
<i>Bacillariophyta</i>	Ast-IMP-BG-257	3	0	6	0	4	0	0	0	0	0	13
	Lic-IMP-BG-462	6	1	1	0	8	3	0	0	0	0	19
	Ple-IMP-BG-458	3	0	3	0	5	1	0	0	0	0	12
	Tab-IMP-BG-480	1	0	4	0	5	2	1	0	0	0	13
	Tha-IMP-BG-463	4	0	1	0	5	5	1	0	0	0	16
<i>Chlorophyta</i>	Ank-IMP-BG-345	1	0	0	0	2	0	0	8	2	1	14
	Ank-IMP-BG-484	4	0	10	4	7	4	3	11	5	2	50
	Coe-IMP-BG-488	2	2	9	2	4	1	3	8	0	0	31
	Com-IMP-BG-302	2	0	5	0	5	2	1	4	0	0	19
	Des-IMP-BG-245	6	2	10	2	5	3	3	14	1	1	47
	Dic-IMP-BG-189	1	0	3	0	3	1	0	3	1	0	12
	Dun-IMP-BG-002	2	0	8	0	3	2	0	7	0	0	22
	Dun-IMP-BG-072	3	0	8	0	3	2	0	7	0	0	23
	Rad-IMP-BG-117	2	0	2	0	5	0	0	2	0	0	11
<i>Cyanophyta</i>	Art-IMP-BG-027	7	4	5	1	6	4	0	0	0	0	27
	Art-IMP-BG-028	7	4	5	1	6	4	0	0	0	0	27
	Cal-T027	6	0	2	0	7	3	0	0	0	0	18
	Cal-T029	7	0	3	0	5	3	0	0	0	0	18
	Mic-T060	6	0	5	0	0	7	0	0	0	0	18
	Nos-T026	6	0	7	0	3	5	0	0	0	0	21
	Scy-T063	8	0	6	0	5	5	0	0	0	0	24
	Tri-T020	11	0	9	0	3	5	0	0	0	0	28
Total		98	13	112	10	99	62	12	64	9	4	483

El mayor detalle de los tipos de lípidos identificados se muestran en las tablas 20, 21 y 22. Los lípidos de mayor recurrencia para el Phylum *Bacillariophyta* fueron: DGDG(20:5/16:2), SQDG(28:0), SQDG(30:0), SQDG(30:1) y SQDG(32:1), para el Phylum *Chlorophyta* fueron: DGDG(18:3/16:3), DGTS(18:3/16:0), DGTS(18:3/18:3), MGDG(18:3/16:4) y SQDG(34:3) y para el Phylum *Cyanophyta* fueron: DGDG(18:3/16:1), MGDG(18:3/16:0), MGDG(18:3/16:1) y PG(18:1/16:0).

Tabla 20. Número de lípidos caracterizados del Phylum *Bacillariophyta*.

Especie	Ast-IMP-BG-257	Lic-IMP-BG-462	Ple-IMP-BG-458	Tab-IMP-BG-480	Tha-IMP-BG-463	Total
DGDG(16:1/14:0)	1	0	0	0	0	1
DGDG(16:1/16:0)	1	0	1	1	0	3
DGDG(16:1/16:1)	1	0	0	1	0	2
DGDG(20:4/16:2)	0	0	1	0	0	1

Especie	Ast-IMP-BG-257	Lic-IMP-BG-462	Ple-IMP-BG-458	Tab-IMP-BG-480	Tha-IMP-BG-463	Total
DGDG(20:5/16:1)	0	0	0	1	0	1
DGDG(20:5/16:2)	2	1	1	1	1	6
DGDG(20:5/16:3)	1	0	0	0	0	1
MGDG(16:1/14:0)	1	0	0	0	0	1
MGDG(16:1/16:0)	0	0	1	0	0	1
MGDG(16:1/16:1)	1	0	0	0	0	1
MGDG(16:3/14:0)	0	1	0	0	0	1
MGDG(16:3/16:1)	0	1	0	0	0	1
MGDG(16:3/16:2)	0	1	0	0	0	1
MGDG(16:3/16:3)	0	1	0	0	0	1
MGDG(16:4/16:3)	0	1	0	0	1	2
MGDG(16:4/16:4)	0	0	0	0	1	1
MGDG(20:4/16:4)	0	0	1	0	0	1
MGDG(20:5/16:3)	1	1	0	1	1	4
MGDG(20:5/16:4)	0	0	1	0	1	2
MGMG(16:3)	0	1	0	0	0	1
PG(16:1/16:0)	0	0	1	1	1	3
PG(18:1/16:0)	0	0	0	1	0	1
PG(18:1/18:1)	0	1	0	0	1	2
PG(19:1/18:1)	0	1	0	0	1	2
PG(20:5/16:0)	0	0	0	0	1	1
PG(20:5/16:1)	0	0	0	0	1	1
PG(20:5/16:2)	0	1	0	0	0	1
PI(16:1/16:0)	0	0	0	1	1	2
SQDG(28:0)	1	1	0	1	1	4
SQDG(29:0)	0	0	0	1	0	1
SQDG(30:0)	1	1	1	1	1	5
SQDG(30:1)	1	1	1	1	0	4
SQDG(30:3)	0	1	0	0	1	2
SQDG(32:1)	1	1	1	1	1	5
SQDG(32:2)	0	0	1	0	0	1
SQDG(32:4)	0	1	0	0	1	2
SQDG(34:5)	0	1	0	0	0	1
SQDG(36:1)	0	0	1	0	0	1
SQDG(36:5)	0	1	0	0	0	1
Total	13	19	12	13	16	73

0: No detectado.

Tabla 21. Número de lípidos caracterizados del Phylum *Chlorophyta*.

Lípido	Ank-IMP-BG-345	Ank-IMP-BG-484	Coe-IMP-BG-488	Com-IMP-BG-302	Des-IMP-BG-245	Dic-IMP-BG-189	Dun-IMP-BG-002	Dun-IMP-BG-072	Rad-IMP-BG-117	Total
Cer_AP(t18:0/24:0+O)	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Cer_AP(t18:0/24:1+O)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cer_AP(t18:0/26:2+O)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Cer_AP(t18:1/22:1+O)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Lípido	Ank-IMP- BG-345	Ank-IMP- BG-484	Coe-IMP- BG-488	Com-IMP- BG-302	Des-IMP- BG-245	Dic-IMP- BG-189	Dun-IMP- BG-002	Dun-IMP- BG-072	Rad-IMP- BG-117	Total
Cer_AP(t18:1/24:0+O)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cer_AP(t18:1/24:1+O)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cer_AP(t18:1/26:0+O)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cer_AP(t18:1/26:1+O)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Cer_NP(t18:0/24:1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Cer_NP(t18:0/26:0)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Cer_NP(t18:1/24:1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DGDG(18:1/16:0)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
DGDG(18:2/16:0)	0	1	1	0	1	0	1	1	0	5
DGDG(18:2/16:2)	0	0	1	0	1	0	1	1	0	4
DGDG(18:2/16:3)	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
DGDG(18:3/14:0)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
DGDG(18:3/16:0)	0	1	1	0	1	0	1	1	0	5
DGDG(18:3/16:1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DGDG(18:3/16:2)	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3
DGDG(18:3/16:3)	0	1	1	1	1	1	2	3	0	10
DGDG(18:3/16:4)	0	1	1	1	1	1	1	1	0	7
DGDG(18:3/18:1)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DGDG(18:3/18:2)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
DGDG(18:3/18:3)	0	1	1	1	1	0	1	0	1	6
DGDG(18:4/18:3)	0	1	1	1	1	0	0	0	1	5
DGDG(18:4/18:4)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
DGMG(16:0)	0	2	2	0	2	0	0	0	0	6
DGMG(18:3)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
DGTS(16:0/16:0)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
DGTS(16:2/16:0)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
DGTS(16:4/16:0)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
DGTS(18:1/16:0)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
DGTS(18:1/16:4)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
DGTS(18:2/16:0)	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3
DGTS(18:3/16:0)	1	2	1	0	2	0	2	2	0	10
DGTS(18:3/16:4)	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
DGTS(18:3/18:2)	0	0	0	0	2	0	1	1	0	4
DGTS(18:3/18:3)	1	1	0	0	2	1	2	2	0	9
DGTS(18:4/16:0)	1	1	1	1	1	0	1	1	1	8
DGTS(18:4/16:4)	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3
DGTS(18:4/18:1)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
DGTS(18:4/18:2)	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
DGTS(18:4/18:3)	1	2	1	1	2	0	0	0	1	8
DGTS(18:4/18:4)	1	1	1	1	1	0	0	0	0	5
MGDG(18:2/16:2)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGDG(18:2/16:3)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGDG(18:2/16:4)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
MGDG(18:3/16:3)	0	2	1	0	0	0	0	2	0	5
MGDG(18:3/16:4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
MGDG(18:3/18:3)	0	1	0	0	3	0	0	0	1	5
MGDG(18:4/16:4)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Lípido	Ank-IMP- BG-345	Ank-IMP- BG-484	Coe-IMP- BG-488	Com-IMP- BG-302	Des-IMP- BG-245	Dic-IMP- BG-189	Dun-IMP- BG-002	Dun-IMP- BG-072	Rad-IMP- BG-117	Total
MGMG(16:3)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGMG(16:4)	0	0	2	0	1	0	0	0	0	3
PG(16:0/16:0)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
PG(18:1/16:0)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
PG(18:1/18:1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PG(18:2/16:0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PG(18:2/16:1)	0	0	0	1	1	0	1	1	0	4
PG(18:3/16:0)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
PG(18:3/16:1)	0	1	0	0	1	0	1	1	0	4
PI(18:1/16:0)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
PI(18:2/16:0)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
PI(18:3/16:0)	0	1	1	1	1	0	0	0	0	4
SQDG(32:0)	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8
SQDG(32:1)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
SQDG(32:2)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
SQDG(32:3)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SQDG(34:1)	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
SQDG(34:2)	0	1	1	1	1	0	1	1	0	6
SQDG(34:3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
SQDG(34:4)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
SQDG(36:1)	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
SQDG(36:6)	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
SQDG(36:7)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	14	50	31	19	47	12	22	23	11	229

0: No detectado.

Tabla 22. Número de lípidos caracterizados del Phylum *Cyanophyta*.

Especie	Art-IMP- BG-027	Art-IMP- BG-028	Cal-T027	Cal-T029	Mic-T060	Nos-T026	Scy-T063	Tri-T020	Total
DGDG(16:1/16:0)	0	0	0	0	0	1	0	1	2
DGDG(16:2/16:0)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
DGDG(16:3/16:0)	0	0	1	0	0	0	1	0	2
DGDG(16:3/16:1)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
DGDG(18:2/16:0)	1	1	0	0	1	1	1	1	6
DGDG(18:2/16:2)	0	0	0	0	0	0	0	2	2
DGDG(18:3/16:0)	1	1	0	0	1	1	1	1	6
DGDG(18:3/16:1)	2	2	0	0	1	1	1	0	7
DGDG(18:3/16:2)	1	1	0	1	0	1	0	1	5
DGDG(18:3/16:3)	0	0	0	0	0	1	0	1	2
DGDG(18:3/18:2)	0	0	0	0	1	0	0	1	2
DGDG(18:3/18:3)	0	0	0	0	1	1	0	1	3
DGDG(18:4/16:0)	0	0	1	2	0	0	0	0	3
DGMG(18:3)	1	1	0	0	0	0	0	0	2
MGDG(16:0/16:0)	0	0	1	1	0	0	0	0	2
MGDG(16:1/16:0)	1	1	0	1	0	1	2	0	6
MGDG(16:2/16:0)	0	0	1	0	0	0	1	0	2

Especie	Art-IMP-BG-027	Art-IMP-BG-028	Cal-T027	Cal-T029	Mic-T060	Nos-T026	Scy-T063	Tri-T020	Total
MGDG(16:3/16:0)	0	0	1	0	0	0	1	0	2
MGDG(16:3/16:1)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
MGDG(18:1/16:0)	0	0	0	0	1	1	0	1	3
MGDG(18:2/16:0)	1	1	0	0	1	1	1	1	6
MGDG(18:2/16:1)	0	0	0	0	0	0	0	3	3
MGDG(18:3/16:0)	2	2	2	2	1	1	1	0	11
MGDG(18:3/16:1)	2	2	0	0	1	1	1	2	9
MGDG(18:3/16:2)	1	1	0	0	0	0	0	1	3
MGDG(18:3/16:3)	0	0	0	0	0	0	0	1	1
MGDG(18:3/18:2)	0	0	0	0	1	0	0	1	2
MGDG(18:3/18:3)	0	0	0	0	1	1	0	1	3
MGDG(18:4/16:0)	0	0	1	0	0	0	0	0	1
MGDG(18:4/16:1)	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGDG(18:4/16:3)	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGDG(18:4/18:4)	0	0	0	1	0	0	0	0	1
MGMG(16:0)	2	2	0	0	0	0	0	0	4
MGMG(18:3)	2	2	0	0	0	0	0	0	4
PG(16:1/16:0)	0	0	0	0	0	1	1	0	2
PG(18:1/16:0)	1	1	1	0	1	1	1	1	7
PG(18:1/18:1)	0	0	0	1	0	0	0	0	1
PG(18:2/16:0)	1	1	1	0	0	1	1	1	6
PG(18:2/16:1)	1	1	0	0	0	0	2	0	4
PG(18:2/18:1)	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PG(18:2/18:2)	1	1	0	0	1	0	0	0	3
PG(18:3/16:0)	0	0	1	1	1	1	0	1	5
PG(18:3/16:1)	0	0	0	1	0	1	0	1	3
PG(18:3/18:1)	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PG(18:3/18:2)	0	0	0	0	1	0	0	0	1
PG(18:3/18:3)	0	0	0	0	1	0	0	1	2
SQDG(16:0/16:0)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
SQDG(18:2/16:0)	0	0	0	0	0	0	0	1	1
SQDG(18:3/16:0)	1	1	0	0	0	0	0	0	2
SQDG(18:3/16:1)	0	0	0	0	0	0	1	0	1
SQDG(32:0)	1	1	1	1	0	0	0	0	4
SQDG(32:1)	0	0	1	1	0	0	0	0	2
SQDG(32:2)	1	1	1	0	0	0	0	0	3
SQDG(34:1)	0	0	0	0	0	1	1	1	3
SQDG(34:2)	1	1	1	1	0	1	1	0	6
SQDG(34:3)	0	0	1	1	0	1	1	1	5
SQDG(34:4)	0	0	1	1	0	0	0	0	2
SQDG(36:3)	1	1	0	0	0	0	0	0	2
SQDG(36:4)	1	1	0	0	0	0	0	0	2
SQDG(36:6)	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	27	27	18	18	18	21	24	28	181

0: No detectado.

4.4. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados

El análisis de componentes principales (Fig. 4) muestra que las componentes PC1 y PC2 explican el 68,96% de la variabilidad de los datos. Los Phylum *Chlorophyta* y *Cyanophyta* tienen una mayor variabilidad de lípidos polares a comparación del Phylum *Bacillariophyta*. También se observa que cada Phylum contiene lípidos polares que los caracterizan separándolos en tres grupos.

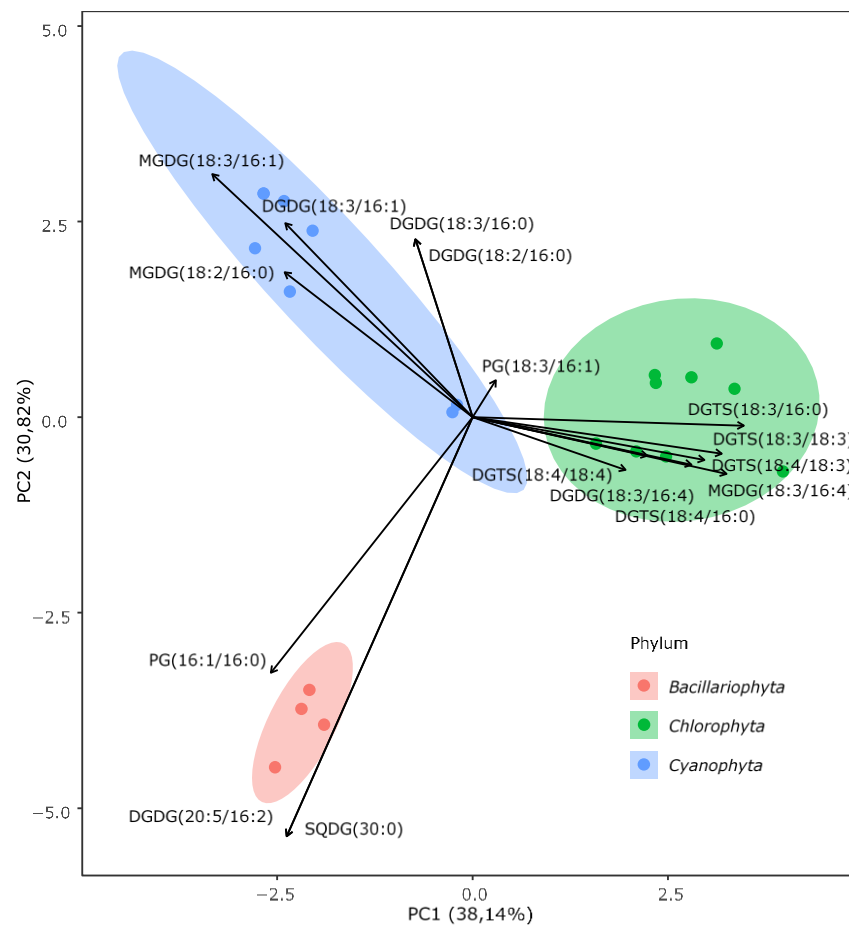


Figura 4. PCA de los lípidos polares

La tabla 23 muestra una recopilación de las patentes que han surgido de la investigación de los lípidos polares relacionados a los estudiados en este trabajo, se observa que desde los años 90s ya se patentaban productos relacionados, y en estos últimos años es donde su número se ha incrementado con mayor velocidad. También se puede observar que los glicolípidos son los lípidos polares que ocupan el mayor número de patentes.

Tabla 23. Patentes relacionadas a los lípidos polares.

Inventor	Fecha	Uso
Arren Bio Co., LTD Kim, <i>et al.</i> ³¹	18.07.2019	El Algasome, extracto de microalgas, que es una mezcla compleja de fosfolípidos, fitoesfingosina, ceramida 3, colesterol, fitoesterol, beta-sitosterol y escualeno, es usado como cosmético para la reducción de las arrugas y la mejora de la elasticidad y humectación de la piel.
Gavish-Galilee Bio APPLICATIONS LTD. Vaya, <i>et al.</i> ³²	28.02.2019	El liso-diacilgliceril- <i>N,N,N</i> -trimetilhomoserina (liso-DGTS) o derivados de los mismos para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.
Geiringer, <i>et al.</i> ³³	16.11.2017	Producción de lípidos polares que contienen EPA con usos como profilácticos o aplicaciones terapéuticas.
Universidad Tokushima Naohiko, <i>et al.</i> ³⁴	07.09.2017	Los MGDG, DGDG y SQDG como inhibidor de las náuseas / vómitos.
부경대학교 산학협력단 홍용기, <i>et al.</i> ³⁵	09.11.2016	Los glicoglicerolípidos como compuestos con actividades antiincrustantes.
Hielscher-Michael, <i>et al.</i> ³⁶	15.09.2016	SQDG como inhibidor de glutaminil ciclasa.
Croci, <i>et al.</i> ³⁷	20.07.2016	Glicolípidos para el tratamiento del dolor.
株式会社サラヴィオ化 粧品 加世田 国与士, <i>et al.</i> ³⁸	27.03.2014	Producción de MGDG, DGDG o similares para ser usados como materiales para cosméticos y antiinflamatorios.
Kobe Gakuin University Yoshiyuki, <i>et al.</i> ³⁹	16.01.2014	MGDG como parte de un tratamiento con actividad antitumoral y anticancerígeno.
Soonchunhyang University Industry Cho, <i>et al.</i> ⁴⁰	30.12.2013	Los glicolípidos como adyuvante de vacunas para peces.
Kale, <i>et al.</i> ⁴¹	11.10.2012	Método de extracción de lípidos polares de algas para su aplicación como surfactantes, detergentes y aditivos alimenticios.
Bluegreen Biotech S R L Molteni ⁴²	26.08.2010	Mezcla de glicolípidos como antiinflamatorios.
Katsuya, <i>et al.</i> ⁴³	10.06.2008	Lípidos polares para mejorar la actividad antiséptica.
Sakimoto, <i>et al.</i> ⁴⁴	05.01.2006	SQDG como radiosensitizador.
Kao Corp Yutaka, <i>et al.</i> ⁴⁵	06.11.2003	Los glicolípidos y otros compuestos para mejorar la capacidad de teñido de un tinte ácido en el cabello.
Chikanari, <i>et al.</i> ⁴⁶	20.11.2001	SQDG como agente de activación de neurocitos.
Scotia Lipid Teknik AB Mervi, <i>et al.</i> ⁴⁷	26.09.2000	SQDG para el tratamiento de psoriasis.
Gwenael, <i>et al.</i> ⁴⁸	30.07.1999	Purificación de SQDG para su uso como estándar analítico.
Winget, <i>et al.</i> ⁴⁹	16.06.1998	MGDG-EPA como antiinflamatorio tópico.
Carlsson, <i>et al.</i> ⁵⁰	06.02.1995	Lípidos polares para preparar cosméticos y productos farmacéuticos.

5.1. Optimización del proceso de extracción de lípidos totales

De acuerdo a los resultados de la tabla 12, la *masa de la muestra* optimizada corresponde al menor valor del rango seleccionado, posiblemente debido a que la mayor proporción solvente/masa produciría una mayor fuerza impulsora de transferencia de masa y por lo tanto una mayor difusión de los lípidos⁵¹.

Por otro lado, la *composición del solvente de extracción* optimizada corresponde aproximadamente al valor central del rango seleccionado, que contiene igual volumen de un solvente de baja polaridad (cloroformo) y un solvente más polar (metanol), para ambas microalgas. Este resultado es equivalente al reportado por Ryckebosch, *et al.*⁵², donde la composición del solvente que obtuvo el mejor rendimiento de extracción fue la mezcla cloroformo/metanol 1:1, según este artículo, la mezcla de solventes es más eficiente debido a que la función del solvente más polar es liberar los lípidos de los complejos proteínas-lípidos y consecuentemente disolverse en un solvente de menor polaridad.

Finalmente, el *tiempo del baño de ultrasonido* optimizado para la microalga *Np* fue menor que para la microalga *Des*, posiblemente debido a dos razones: diferencias en la pared celular y diferencias en la cantidad de gotas lipídicas. La microalga *Des* presenta una pared celular gruesa conteniendo ornamentaciones (espinas) formadas por la capa más externa, además de los cenobios que se encuentran dispuestos en línea alternada y de cuatro unidades por colonia (Fig. 5), por otra parte, la microalga *Np* solo posee una pared celular lisa recubierta por una capa exterior que consiste en un polímero alifático llamado “algaenan” y sería más fácil la ruptura celular a comparación de la primera. Además, los lípidos en la microalga *Np* se concentran en pocas gotas lipídicas⁵³, a comparación de la microalga *Des* que se encuentran un mayor número de gotas lipídicas⁵⁴, dificultando así la extracción, resultado similar al reportado por Vasconcelos, *et al.*⁵⁵, donde explican que al haber mayor cantidad de gotas lipídicas las interacciones de los complejos proteínas-lípidos serán mayores dificultando el proceso de extracción.

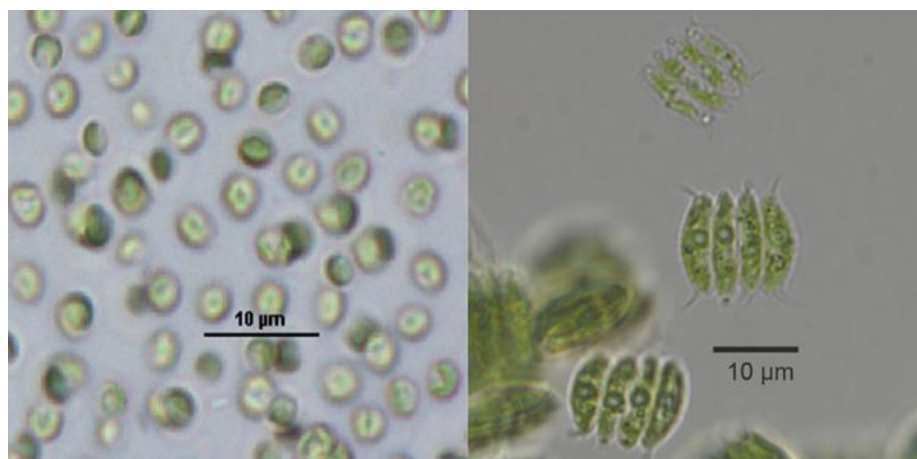


Figura 5. Fotos de las microalgas *Nannochloropsis oceanica* (Izquierda) y *Desmodesmus asymmetricus* (Derecha), Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos- IMARPE.

5.2. Efectos de los parámetros del UHPLC-QTOF sobre el área del ion molecular y el tiempo de retención de los lípidos polares

La tabla 14 muestra que para el caso de la microalga *Np* los porcentajes de lípidos neutros (F4) y lípidos polares (F3) fueron aproximadamente 37% y 3%. Al comparar estos resultados con el rango reportado por Ma, *et al.*⁵⁶, en estudios realizados de tres cepas de microalgas *Nannochloropsis oceanica* bajo condiciones controladas de laboratorio, cuyos resultados de lípidos neutros y polares fueron 23-32% y 21-26% respectivamente, se puede inferir que la microalga *Np* estudiada ha sufrido un estrés por las condiciones de cultivo en el invernadero incrementando sus niveles de lípidos neutros y disminuyendo los niveles de lípidos polares, efecto similar al reportado por Wei, *et al.*⁵⁷.

Por otra parte, para el caso de la microalga *Des*, los porcentajes de lípidos neutros y lípidos polares fueron aproximadamente 9% y 2%, cuyos valores son aproximadamente similares al reportado por Choi, *et al.*⁵⁸, en cultivos de la microalga *Scenedesmus obliquus* bajo condiciones de laboratorio, lo que indicaría que la microalga estudiada no ha sufrido un estrés relevante por las condiciones de cultivo en el invernadero. De otro lado, los lípidos identificados en la tabla 15 coinciden con lo reportado por Yao, *et al.*³ para ambas microalgas.

De acuerdo a la jerarquía de estabilidad de iones moleculares mostrada por Biemann⁵⁹, la diferencia en el efecto de la *energía de colisión* sobre el *área relativa*

del ion molecular de la tabla 16, se debe a los grupos funcionales. En el caso de la clase GL, la presencia del ácido sulfónico del lípido SQDG, con capacidad para formar estructuras resonantes, proporciona una mayor estabilidad al ion molecular a comparación de los lípidos MGMG, MGDG y DGDG donde el grupo galactosa por sí solo no tiene esta capacidad. En el caso de la clase PL, los lípidos PC y LPC tienen una menor estabilidad debido a la presencia de la amina cuaternaria en comparación de los lípidos PI y PG que no lo tienen. En el caso de la clase BL, a pesar que presenta una amina cuaternaria, la mayor estabilidad de esta molécula se debe al grupo éter.

De acuerdo al principio del modo de ionización, el efecto del *modo de ionización (ESI)* sobre el *área relativa del ion molecular*, está relacionado a la preferencia de las moléculas por la formación de iones positivos o negativos. Para el caso de la clase GL, de acuerdo a da Costa, *et al.*⁴, el modo ESI (+) incrementa el *área relativa del ion molecular* de los lípidos neutros MGDG, MGMG y DGDG debido a que los oxígenos del grupo galactosilo prefieren formar moléculas protonadas $[M+H]^+$, aductos de sodio $[M+Na]^+$, aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ u otros cationes. Mientras que el modo ESI (-) incrementa el *área relativa del ion molecular* de los lípidos SQDG, debido a la presencia del grupo sulfoquinovosil cargado negativamente y forma iones negativos $[M-H]^-$. De otro lado, para la clase PL, el modo ESI (+) incrementa el *área relativa del ion molecular* de los lípidos LPC y PC debido a que, durante el proceso de ionización, la amina cuaternaria del grupo colina forma fácilmente la especie $[M+H]^+$, y el anión fosfato puede protonarse⁶⁰. Así mismo el modo ESI (-) incrementa el *área relativa del ion molecular* de los lípidos PI y PG debido a la habilidad del grupo fosfato de cargarse negativamente. Para la clase BL, el modo ESI (+) incrementa el *área relativa del ion molecular* del lípido DGTS en un proceso similar al ocurrido para los lípidos LPC y PC.

De acuerdo a Dolan⁶¹, el efecto significativo del pH sobre el *tiempo de retención* (tabla 17) se debe al carácter ácido y básico de los analitos, en cromatografía de fase reversa al aumentar el pH en la fase móvil, la especie ácida estará más ionizada y por tanto su tiempo de retención será menor, mientras que la especie básica estará menos ionizada y su tiempo de retención será mayor. Estas desviaciones concuerdan con nuestros resultados, ya que los lípidos SQDG, PI y PG tienen carácter ácido y los lípidos MGMG, MGDG, DGDG, LPC, PC y DGTS tienen carácter básico⁶².

5.3. Screening de los lípidos polares en microalgas nativas

De acuerdo a la tabla 18, más del 60% de las microalgas analizadas tienen un porcentaje de lípidos polares con respecto de los lípidos totales entre 30 y 85% (w/w), resultado semejante al publicado por Brooks, *et al.*⁶³, donde menciona que la mayoría de aceites de microalgas contienen lípidos polares en ese rango. Una observación interesante durante la extracción de los lípidos fue la aparición de una emulsión estable en la interfase orgánica/acuosa para algunas microalgas, esto se debe a que los lípidos de las algas contienen un alto porcentaje de lípidos polares y proteínas lo que permite la emulsificación de los lípidos neutros. La emulsificación, además es estabilizada por los nutrientes y las sales de la solución⁴¹.

De acuerdo a la tabla 20, las microalgas analizadas del Phylum *Bacillariophyta* presentan en su mayoría las clases de lípidos MGDG, DGDG, SQDG y PG con los ácidos grasos 14:0, 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4, 20:4 y 20:5. Estos resultados son similares a los reportados por Hunter, *et al.*⁶⁴ para el caso de la microalga *Thalassiosira pseudonana*, la diferencia más evidente es que no se incluye los lípidos polares con el ácido graso 16:4, por ejemplo MGDG(16:4/16:3), MGDG(16:4/16:4) y MGDG(20:5/16:4), ácido graso detectado por Wichard, *et al.*⁶⁵ para las microalgas *T. rotula* y *T. pseudonana* pero no para la microalga *T. weissfloggi*, según Taipale⁶⁶ este ácido graso es encontrado solo en su grupo fitoplanctónico. Al comparar estos resultados con lo reportado por Wacker, *et al.*⁶⁷ para la microalga *Asterionella formosa*, coinciden con los lípidos detectados excepto para los lípidos con el ácido graso 14:0, por ejemplo DGDG(16:1/14:0) y MGDG(16:1/14:0), ácido graso detectado por Rubi⁶⁸ para dos cepas de la microalga *A. glacialis* y presentado por Taipale, *et al.*⁶⁶ y Hernández, *et al.*⁶⁹ como un ácido graso mayoritario para este Phylum.

De acuerdo a la tabla 21, las microalgas analizadas del Phylum *Chlorophyta* presentan en su mayoría las clases de lípidos DGDG, DGTS, MGDG, PG y SQDG con los ácidos grasos 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4, 18:1, 18:2, 18:3 y 18:4. Estos resultados son similares a los reportados por So-Hyun, *et al.*⁷⁰ para la microalga *Dunaliella tertiolecta*. De otro lado, Hu, *et al.*⁷¹, para el caso de la microalga *Desmodesmus* sp., no reportan los lípidos DGTS ni los lípidos que contienen al ácido

graso 18:4. Este ácido graso está presente en una amplia variedad de microalgas del Phylum *Chlorophyta*⁶⁹, y el lípido DGTs es abundante en este Phylum⁷². El resultado inesperado cuando se analizaron estos extractos fue la presencia de las fitoceramidas CerAp y CerNP (Fig. 6), estas son similares a lo publicado por Rose⁷³, donde se muestran fitoceramidas con las bases esfingoides t18:0 y t18:1 y restos de ácidos grasos de 24 y 26 carbonos para las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlamydomonas*, aunque existe una principal diferencia en las estructuras de esta publicación, todas la fitoceramidas tienen restos de azúcares como la hexosa. En nuestro caso, no se observan estos restos en el espectro de masas de ninguna de las fitoceramidas identificadas (Fig. 8, anexo).

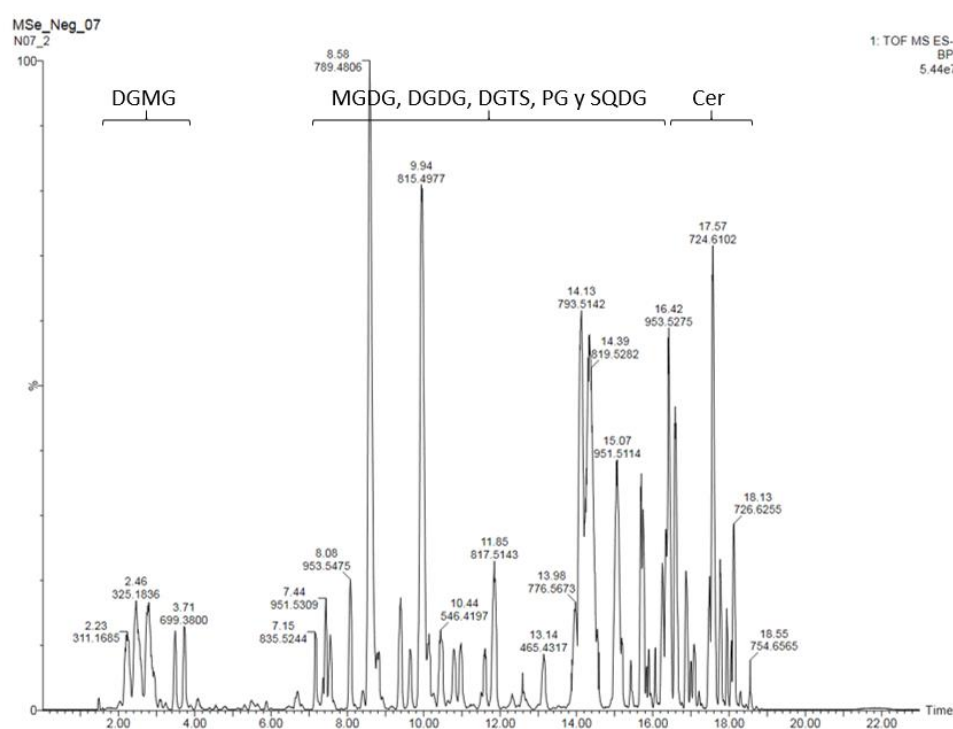


Figura 6. Cromatograma típico de la microalga *Ankistrodesmus falcatus* en modo ESI (-).

De acuerdo a la tabla 22, las microalgas analizadas del Phylum *Cyanophyta* presentan en su mayoría las clases de lípidos DGDG, MGDG, PG y SQDG con los ácidos grasos 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 18:1, 18:2, 18:3 y 18:4. Resultados que están de acorde a lo publicado por Kumaj, *et al.*⁷⁴ para la microalga *Scytonema geitleri* y por Xue, *et al.*⁷⁵ para la microalga *Spirulina platensis*. Con respecto de las clases de lípidos minoritarios MGMG, coinciden con los publicados por Herrero, *et al.*⁷⁶ para la microalga *Spirulina platensis*.

5.4. Análisis de componentes principales y potencial económico de los lípidos polares identificados

De acuerdo al análisis de componente principales (Fig. 4), los lípidos que caracterizan a cada Phylum son: PG(16:1/16:0), DGDG(20:5/16:2) y SQDG(30:0) para *Bacillariophyta*; DGTS(18:3/16:0), DGTS(18:3/18:3), DGTS(18:4/18:3), MGDG(18:3/16:4), DGTS(18:4/18:4), DGDG(18:3/16:4) y DGTS(18:4/16:0) para *Chlorophyta*; y MGDG(18:2/16:0), MGDG(18:3/16:1), DGDG(18:3/16:1), DGDG(18:3/16:0) y DGDG(18:2/16:0) para *Cyanophyta*; el lípido PG(18:3/16:1) fue común para el Phylum *Chlorophyta* y *Cyanophyta*. De acuerdo a Mimouni, *et al.*¹⁸ estas clases de lípidos polares son las más comunes identificadas en microalgas, entonces la separación de los grupos se debe a otros factores como el tipo de ácido graso y las clases de lípidos particulares de cada Phylum, de hecho, los lípidos polares DGDG(20:5/16:2) y SQDG(30:0) del Phylum *Bacillariophyta* contienen los ácidos grasos 20:5 y con alta probabilidad 14:0, mayoritarios para este Phylum⁶⁶, y permitirían una mayor separación de este grupo. En cambio, el Phylum *Chlorophyta* y *Cyanophyta* mantienen lípidos polares en común, lo que explicaría la cercanía de estos grupos. La principal razón de la separación de estos se debe a que los lípidos DGTS son abundantes en el Phylum *Chlorophyta*⁷². La tabla 24 muestra un resumen de los lípidos identificados como marcadores quimio-taxonómicos.

Tabla 24. Propuesta de marcadores quimio-taxonómicos de los Phylum analizados.

Phylum	Marcador quimio-taxonómico
<i>Bacillariophyta</i>	PG(16:1/16:0), DGDG(20:5/16:2) y SQDG(30:0)
<i>Chlorophyta</i>	DGTS(18:3/16:0), DGTS(18:3/18:3), DGTS(18:4/18:3), MGDG(18:3/16:4), DGTS(18:4/18:4), DGDG(18:3/16:4), DGTS(18:4/16:0) y PG(18:3/16:1)
<i>Cyanophyta</i>	MGDG(18:2/16:0), MGDG(18:3/16:1), DGDG(18:3/16:1), DGDG(18:3/16:0), DGDG(18:2/16:0) y PG(18:3/16:1)

De otro lado, para determinar la aplicación potencial de los extractos a la cadena de valor del biocomercio, se debe considerar la adecuada selección de las cepas de microalgas de acuerdo a los siguientes criterios⁶³: un alto contenido de lípidos como porcentaje en peso, fácil crecimiento, fácil propagación, fácil procesamiento de biomasa, perfil de glicerolípidos y la ausencia de toxinas. A pesar que la producción de metabolitos de los microorganismos dependen de varios factores, la concentración

de lípidos polares en el cultivo de las microalgas, F3 (tabla 18), puede servir como aproximación de los primeros cuatro criterios mencionados, en este caso se puede observar que los Phylum *Chlorophyta* y *Cyanophyta*, contienen los mejores candidatos en lo que a producción de lípidos polares se refiere, sobresaliendo las cepas Ank-IMP-BG-345, Des-IMP-BG-245, Art-IMP-BG-027 y Art-IMP-BG-028. Con respecto del perfil de glicerolípidos, a pesar que el Phylum *Bacillariophyta* no presenta altos rendimientos de producción de lípidos polares, si presenta ácidos grasos que no se detectaron en los otros dos Phylum, como son los ácidos grasos 20:4 y 20:5 (tabla 20), ácidos grasos poliinsaturados con amplias aplicaciones comerciales en la actualidad y con una patente explícita mostrada en la tabla 23, para el caso del lípido MGDG-EPA, identificado en todas las cepas analizadas de este Phylum.

Los otros dos Phylum presentan lípidos polares interesantes, en especial el Phylum *Chlorophyta* que presentó una amplia variedad de lípidos de betaína y también fitoceramidas, en especial la cepa Ank-IMP-BG-484, con hasta 7 tipos de fitoceramidas identificadas, especialmente útiles para la cosmética, es importante mencionar la patente de Kim, *et al.*³¹ del año 2019, donde el extracto de microalgas que patentan contiene ceramidas y sus aplicaciones son cosméticas. Con respecto de los glicolípidos la mayoría de patentes de la tabla 23 hace referencia a estos, en especial, a los lípidos SQDG que de acuerdo a la tabla 19, cualquiera de las cepas analizadas estaría en la posibilidad de obtener productos relacionados, con excepción de la cepa Mic-T060, que no se detectaron estos lípidos.

Con respecto de las toxinas, Fox, *et al.*⁷⁷, muestra una tabla para microalgas comerciales, donde en el Phylum *Cyanophyta* se han reportado más de 60 toxinas potenciales incluyendo hepatotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas, en el Phylum *Bacillariophyta* se han reportado neurotoxinas como el ácido domoico, aunque en esta publicación no se muestran toxinas para el Phylum *Chlorophyta*, Brooks, *et al.*⁶³ muestra el caso de una *Chlorella* comercial contaminada con un género de la cianobacteria *Lyngbya* el cual es conocido por producir toxinas y contaminaría de manera indirecta la producción.

La siguiente etapa, una vez decidida la cepa potencial, debería continuar con estudios de biotecnología para optimizar los metabolitos potenciales y las tecnologías para el

cultivo masivo de las microalgas. Estas investigaciones permitirían lograr productos y consolidar cadenas de valor orientadas a la producción de lípidos polares de microalgas para las diferentes industrias de la actualidad y del futuro.

El análisis de los principios y criterios del biocomercio permiten determinar la factibilidad del cumplimiento de estas y la incorporación de las microalgas al biocomercio.

Principio N° 1, *Conservación de la biodiversidad*. Las microalgas al ser microorganismos acuáticos fotosintéticos, solo requerirían de un espacio con luz solar y la cercanía a una fuente de agua para su desarrollo, haciendo posible su cultivo en cualquier lugar incluso en áreas desérticas, como es el caso de la compañía Algatech, el cual cultiva la microalga *Haematococcus pluvialis* en el desierto Aravá en Israel⁷⁸. Lo cual permite un impacto mínimo en los ecosistemas y hábitats naturales.

Principio N° 2, *Uso sostenible de la biodiversidad*. Dependiendo del sistema de cultivo, las microalgas logran altas tasas de crecimiento y propagación, por ejemplo, en promedio pueden recuperar su concentración inicial al pasar de un volumen de 20 mL a uno de 250 mL en tan solo 7 días¹⁷. Esta alta capacidad de productividad garantiza el uso del recurso genético de manera sostenible.

Principio N° 3, *Distribución justa y equitativa de los beneficios derivados del uso de la biodiversidad*. Características de las microalgas como: su alta velocidad de crecimiento, propagación y facilidad de cultivo permitirían una industria autosostenible, bajo este esquema, los actores “clásicos” como los productores rurales y los acopiadores no estarían presentes y solo estarían presentes los procesadores y comercializadores, al existir menos actores, las negociaciones para la distribución justa y equitativa de los beneficios tendría menor dificultad y se realizaría con mayor transparencia y confianza.

Principio N° 4, *Sostenibilidad socio-económica*. Existen varios autores en la actualidad, Muhammad, *et al.*⁷, Gatamaneni, *et al.*⁸ y Barkia, *et al.*⁹, que resaltan no solo el potencial de los biocompuestos de las microalgas, sino que afirman que el mercado potencial de estas generará industrias multimillonarias en el futuro, por lo

que el potencial de mercados está asegurado. La generación de esta industria poco promovida en el país generaría empleo y la mejora de la calidad de vida de la población sin afectar las prácticas productivas y culturales locales.

Principio N° 5, *Cumplimiento de la legislación nacional e internacional*. Si se implementan mecanismos adecuados para cumplir con las normas y leyes nacionales e internacionales relacionadas al biocomercio, este principio se cumpliría sin dificultad.

Principio N° 6, *Respeto de los derechos de los actores involucrados*. Si se implementan mecanismos adecuados para cumplir con las normas y leyes relacionadas al respeto de los derechos humanos, propiedad intelectual, seguridad laboral y condiciones de trabajo de los actores involucrados, este principio se cumpliría sin dificultad.

Principio N° 7, *Claridad sobre la tenencia de la tierra, el uso y acceso a los recursos y a los conocimientos*. Si se cultiva en áreas desérticas como en el caso del Principio N° 1, se tendría claridad sobre la tenencia de la tierra. El consentimiento al acceso a los recursos genéticos, en este caso, sería brindado, al menos inicialmente, por el Banco de Germoplasma del IMARPE, luego se debería gestionar el Contrato de Acceso ante el Viceministerio de Pesca y Acuicultura de PRODUCE y finalmente el certificado internacional de cumplimiento del Protocolo de Nagoya (CCRI) ante MINAM. En el caso de existir conocimientos tradicionales involucrados, se debería seguir los lineamientos de la Ley N° 27811 “Régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas vinculados a la biodiversidad” y otras normas relacionadas para cumplirlo.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- (1) Los factores más relevantes en la extracción de lípidos fueron la *masa de la muestra* y la *composición del solvente de extracción*, mientras que el *tiempo del baño de ultrasonido* estuvo influenciado por el tipo de microalga y, por lo tanto, se recomienda utilizar los siguientes factores optimizados: 25 mg/3 mL de solvente, cloroformo/metanol 1:1 y 30 min respectivamente.
- (2) Los factores más relevantes para la detección del ion molecular fueron la *energía de colisión* y el *modo de ionización*, el tiempo de retención estuvo influenciado principalmente por el *pH de la fase móvil*, con un efecto máximo de $\pm 0,6$ min. Los factores óptimos dependen de la clase de lípido y deben ser determinados previos a su estudio.
- (3) Las fracciones de las microalgas analizadas mostraron una amplia variedad de lípidos polares. Los más relevantes fueron: MGDG, DGDG, SQDG, PG, DGTS y Cer, todos contenían una amplia variedad de ácidos grasos, en su mayoría poliinsaturados, desde 14 hasta 20 carbonos.
- (4) El análisis de componentes principales demostró la presencia de lípidos característicos de cada Phylum, los cuales pueden ser usados como marcadores en estudios quimio-taxonómicos. Además, se determinó que los lípidos polares identificados de muchas de las microalgas analizadas tienen un alto potencial para su aplicación al biocomercio, principalmente como ingredientes para la cosmética y la farmacéutica, por lo tanto, se recomienda, continuar este trabajo con los estudios de eficacia cosmética y farmacéutica.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jones J, Manning S, Montoya M, Keller K, Poenie M. Extraction of algal lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry. *J Am Oil Chem Soc* [Internet]. 2012 [consultado 20 ago 2019]; 89(8):1371-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2044-8>.
2. Li S, Xu J, Jiang Y, Zhou C, Yu X, Zhong Y, *et al.* Lipidomic analysis can distinguish between two morphologically similar strains of *Nannochloropsis oceanica*. *J Phycol* [Internet]. 2015 [consultado 20 ago 2019]; 51(2):264-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jpy.12271>.
3. Yao L, Gerde JA, Lee SL, Wang T, Harrata KA. Microalgae lipid characterization. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2015 [consultado 20 ago 2019]; 63(6):1773-87. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf5050603>.
4. da Costa E, Silva J, Hoffman Mendonca S, Abreu MH, Domingues MR. Lipidomic approaches towards deciphering glycolipids from microalgae as a reservoir of bioactive lipids. *Mar Drugs* [Internet]. 2016 [consultado 20 ago 2019]; 14(5):1-27. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/md14050101>.
5. Rodríguez-Luna A, Talero E, Terencio MdC, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, de los Reyes C, *et al.* Topical application of glycolipids from *Isochrysis galbana* prevents epidermal hyperplasia in mice. *Mar Drugs* [Internet]. 2017 [consultado 20 ago 2019]; 16(1):1-19. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/md16010002>.
6. Dahli L, Atrahimovich D, Vaya J, Khatib S. Lyso-DGTS lipid isolated from microalgae enhances PON1 activities in vitro and in vivo increases PON1 penetration into macrophages and decreases cellular lipid accumulation. *BioFactors* [Internet]. 2018 [consultado 20 ago 2019]; 44(3):299-310. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/biof.1427>.
7. Muhammad Imran K, Jin Hyuk J, Jong Deog K. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2018 [consultado

- 20 ago 2019]; 17(36):1-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
8. Gatamaneni Loganathan B, Orsat V, Lefsrud M. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environ Eng Res* [Internet]. 2018 [consultado 20 ago 2019]; 23(3):229-41. Disponible en: <https://doi.org/10.4491/eer.2017.220>
 9. Barkia I, Saari N, Manning SR. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Mar Drugs* [Internet]. 2019 [consultado 20 ago 2019]; 17(5):304-33. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/md17050304>.
 10. Ran W, Wang H, Liu Y, Qi M, Xiang Q, Yao C, *et al.* Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresour Technol* [Internet]. 2019 [consultado 20 ago 2019]; 291(121894). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>.
 11. Li Y, Huang J. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis*. *J Phycol* [Internet]. 2009 [consultado 20 ago 2019]; 45(3):635-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>.
 12. Burja A, Banaigs B, Abou-Mansour E, Burgess J, Wright P. Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron* [Internet]. 2001 [consultado 20 ago 2019]; 57(46): 9347-77. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00931-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00931-0).
 13. Hamed I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology. *Compr Re Food Sci F* [Internet]. 2016 [consultado 20 ago 2019]; 15(6):1104-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>.
 14. Borowitzka MA. Biology of microalgae. In Levine IA, Fleurence J. *Microalgae in health and disease prevention* [Internet]. Londres: Academic Press; 2018 [consultado 20 ago 2019];23-59. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>.
 15. Arias M, Martínez A, Cañizares R. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta biol Colomb*

- [Internet]. 2013 [consultado 20 ago 2019]; 18(1):43-68. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/32832/40207>.
16. Gouveia L, Batista AP, Sousa I, Raymundo A, Bandarra NM. Microalgae in novel food products. In Papadopoulos KN. Food chemistry research developments [Internet]. Nueva York: Nova Science Publishers; 2008 [consultado 20 ago 2019]:75-112. Disponible en: [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2434/1/REP-I.Sousa CapLivro%20algasGouveia.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2434/1/REP-I.Sousa%20CapLivro%20algasGouveia.pdf).
 17. FAO. Manual on the production and use of live food for aquaculture [Internet]. Manual. Roma: University of Ghent, Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center; 1996 [consultado 20 ago 2019]. Report No.: ISBN 92-5-103934-8. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w3732e/w3732e00.htm>.
 18. Mimouni V, Couzinet-Mossion A, Ulmann L, Wielgosz-Collin G. Lipids from microalgae. In Levine I, Fleurence J. Microalgae in health and disease prevention [Internet]. Nantes: Academic Press; 2018 [consultado 20 ago 2019]:109-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00005-0>.
 19. MS-DIAL. Nomenclature in MS-DIAL lipidomics [Internet]. Kanagawa (Japón): MS-DIAL; 2019 [consultado 12 oct 2019]. Disponible en: http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/index5.html.
 20. Bristow T. European Pharmaceutical Review [Internet]. Brasted (Inglaterra): European Pharmaceutical Review; 2011 [consultado 27 oct 2019]. Disponible en: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/7678/evolution-and-revolution-in-time-of-flight-mass-spectrometry-and-its-impact-on-research-within-the-pharmaceutical-industry/>.
 21. Li-Beisson Y, Nakamura Y, Harwood J. Lipids: From chemical structures, biosynthesis, and analyses to industrial applications. In Nakamura Y, Li-Beisson Y. Lipids in plant and algae development [Internet]. Londres: Springer; 2016 [consultado 27 Oct 2019]:1-17. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_1.
 22. Cajka T, Fiehn O. LC-MS-Based lipidomics and automated identification of lipids using the LipidBlast In-Silico MS/MS library. Methods Mol Biol [Internet]. 2017

- [consultado 27 Oct 2019];; 1609:149-71. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6996-8_14.
23. MINCETUR. Estrategia Nacional de Biocomercio y su Plan de Acción al 2025. El Peruano [Internet]. 2016 [consultado 20 ago 2019]:594946 - 64. Disponible en: <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/estrategia-nacional-de-biocomercio-y-su-plan-de-accion-al-20-anexo-ds-n-008-2016-mincetur-1409578-1>.
 24. Credence Research. Algae products market by application growth, future prospects & competitive analysis, 2018 – 2026 [Internet]. San José (Estados Unidos de América): Credence Research; 2018 [consultado 12 oct 2019]. Disponible en: <https://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market>.
 25. García JL, de Vicente M, Galán B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. Microb Biotechnol [Internet]. 2017 [consultado 20 ago 2019]; 10(5):1017-24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12800>.
 26. Global Market Insights. EPA/DHA (Omega 3) ingredients market size by application [Internet]. Delaware (Estados Unidos de América): Global Market Insights; 2016 [consultado 12 oct 2019]. Disponible en: <https://www.gminsights.com/pressrelease/EPA-DHA-omega-3-ingredients-market>.
 27. Guthrie W. Process modeling. In NIST. Engineering statistics [Internet]. 2013 [consultado 20 ago 2019]. Disponible en: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pmd/pmd.htm>.
 28. Folch J, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem [Internet]. 1957 [consultado 20 ago 2019]; 226(1):497-509. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/226/1/497.short>.
 29. Isaac G, McDonald S, Astarita G. Lipid separation using UPLC with Charged Surface Hybrid Technology [Internet]. Milford (Estados Unidos de América): Waters; 2011 [consultado 12 oct 2019]. Disponible en: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004107en.pdf>.
 30. Lens. Lens Solving The problem of problem solving [Internet]. Canberra (Australia): Lens; 2019 [consultado 2 set 2019]. Disponible en: <https://www.lens.org>.

31. Kim CJ. Cosmetic composition containing Algasome comprising microalgae extract therein. Korea patent WO/2019/139214. 24 ago 2018.
32. Vaya J, Khatib S, Kvitnitsky E. Compositions and methods for treating atherosclerotic cardiovascular disease. Estados Unidos de América patent WO/2019/038764. 28 feb 2019.
33. Geiringer KT, Griffiths HT. Production of ultrapure EPA and polar lipids from largely heterotrophic culture. Estados Unidos de América patent US 2017/0326090 A1. 16 nov 2017.
34. Naohiko H, Junji I, Futoshi T, Yutaka T. Nausea/vomiting suppression agent, gene expression inhibitor, food, quasi-drug, and cosmetic. Japón patent 2017154979. 07 set 2017.
35. 홍용기, 신현웅, 조지영. Anti-fouling material based on glycolipid isolated from microalgae *Pavlova lutheri*. República de Corea patent 1020160129285. 09 nov 2016.
36. Hielscher-Michael S, Griel C, Demuth HU, Schilling S, Wessjohann L, Arnold N. Sulfolipids as new glutaminyl cyclase inhibitors. Alemania patent US 2018/0228825 A1. 15 set 2016.
37. Croci T, Guagnini F, Zarini E. A mixture of polar glycolipids for use in the treatment of pain. Europa patent WO 2013/139657. 13 mar 2013.
38. 加世田 国与士, 松島 一幸, 宮崎 博文. Composition comprising essence extracted from algae body, and composition for cosmetics, drug for treating and preventing inflammatory disease, as well as novel microorganism. Japón patent 2014055128. 27 mar 2014.
39. Mizushima Y, Yoshida H, Sasaki R. Pharmaceutical composition or food product composition comprising monogalactosyldiacylglycerol or pharmaceutically acceptable salt thereof as active ingredient. Japón patent WO/2014/010742. 16 ene 2014.
40. Cho JY. Vaccine adjuvant containing glycolipids. República de Corea patent 1020130142318. 30 dic 2013.

41. Kale A. Extraction of polar lipids by a two solvent method. Estados Unidos de América patent WO 2012/138382 A1. 11 oct 2012.
42. Molteni M. Glycolipid mixture with antiinflammatory activity obtained from *Oscillatoria Planktothrix*. Estados Unidos de América patent WO 2010/094693 A1. 26 ago 2010.
43. Katsuya Ueno , Hiromoto Mizushima W, Hiromi Kubota T, Katsumi Kubota T. Agent for enhancing antiseptic power. Estados Unidos de América patent US 2009/0156511 A1. 10 jun 2008.
44. Sakimoto I, Miura M, Kataoka K, Sakaguchi K, Sugurawa F, Ohta K, *et al.* Rasiosensitizer. Japón patent WO 2006/001374 A1. 05 ene 2006.
45. Yutaka S, Hiroyuki K, Nozomi N, Kazunori M. Acidic hair-dyeing cosmetic. Japón patent 2003313115. 06 nov 2003.
46. Chikanari T, Keisuke K, Marina N, Mikiro T, Naohiko H, Yoshikazu I, *et al.* Neurocyte activation agent and its use. Japón patent JP 2001322935 A. 20 nov 2001.
47. Mervi V, Wenche R, Lars B. Sulpholipid composition and methods for treating skin disorders. Suecia patent 6124266. 26 set 2000.
48. Gwenael B, Patrick D, Francois DLP. Purification of sulfoquinovosyl diacyl glycerol from total glycolipid extract of natural product, especially alga, for use as chromatographic standard - by centrifugal partition chromatography. Francia patent FR 2774094 A1. 30 jul 1999.
49. Winget RR. Anti-inflammatory compositions containing monogalactosyl dieicosapentaenoyl glycerol and methods relating thereto. Estados Unidos de América patent 5767095. 16 jun 1998.
50. Carlsson A, Herslof B. Lipophilic carrier preparations. Australia patent AU-B-17235/95. 06 feb 1995.
51. Kostic MD, Jokovic NM, Stamenkovic OS, Rajkovic KM, Milic PS, Veljkovic VB. Optimization of hempseed oil extraction by n-hexane. Ind Crops Prod [Internet]. 2013 [consultado 25 set 2019]; 48:133-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.028>.
52. Ryckebosch E, Muylaert K, Foubert I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. J Am Oil Chem Soc [Internet]. 2012

- [consultado 25 set 2019]; 89(2):189-98. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1903-z>.
53. Dong HPP, Williams E, Wang Dz, Xie ZX, Hsia Rc, Jenck A, *et al.* Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. Plant Physiol [Internet]. 2013 [consultado 25 set 2019]; 162(2):1110–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.113.214320>.
 54. Javee A, Sulochana SB, Palliserry SJ, Arumugam M. Major lipid body protein: A conserved structural component of lipid body accumulated during abiotic stress in *S. quadricauda* CASA-CC202. Front. Energy Res [Internet]. 2016 [consultado 25 set 2019]; 4(37):1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00037>.
 55. Vasconcelos B, Teixeira JC, Dragone G, Teixeira JA. Optimization of lipid extraction from the oleaginous yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Lipomyces kononenkoae*. AMB Express [Internet]. 2018 [consultado 25 set 2019]; 8(126):1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0658-4>.
 56. Ma Y, Wang Z, Yu C, Yin Y, Zhou G. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. Bioresour Technol [Internet]. 2014 [consultado 25 set 2019]; 167:503-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.047>.
 57. Wei L, Huang X. Long-duration effect of multi-factor stresses on the cellular biochemistry, oil-yielding performance and morphology of *Nannochloropsis oculata*. PLoS One [Internet]. 2017 [consultado 25 set 2019]; 12(3):1-20. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174646>.
 58. Choi KJ, Nakhost Z, Barzana E, Karel M. Lipid content and fatty acid composition of green algae *Scenedesmus obliquus* grown in a constant cell density apparatus. Food Biotechnol [Internet]. 1987 [consultado 25 set 2019]; 1(1):117-28. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/08905438709549660>.
 59. Biemann K. The application of mass spectrometry in organic chemistry : determination of the structure of natural products [Internet]. Angew Chem. 1962 [consultado 25 set 2019]; 1(2):98-111. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/anie.196200981>.

60. Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev* [Internet]. 2003 [consultado 25 set 2019]; 22(5):332-64. Disponible en : <https://doi.org/10.1002/mas.10061>.
61. Dolan JW. Back to basics: The role of pH in retention and selectivity. *LC GC N Am* [Internet]. 2017 [consultado 25 set 2019]; 35(1):22-8. Disponible en : <http://www.chromatographyonline.com/back-basics-role-ph-retention-and-selectivity>.
62. Zhou Y, Peisker H, Dörmann P. Molecular species composition of plant cardiolipin determined by liquid chromatography mass spectrometry. *J Lipid Res* [Internet]. 2016 [consultado 25 set 2019]; 57(7):1308-21. Disponible en : <https://doi.org/10.1194/jlr.D068429>.
63. Brooks G, Franklin S. Cosmetic compositions comprising microalgal components. Estados Unidos de América patent US 8,557,249 B2. 13 oct 2013.
64. Hunter JE, Bradsma J, Dymond MK, Koster G, Mack Moore C, Postle AD, *et al*. Lipidomics of *Thalassiosira pseudonana* under phosphorus stress reveal underlying phospholipid substitution dynamics and novel diglycosylceramide substitutes. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2017 [consultado 25 set 2019]; 84(6):1-17. Disponible en : <https://doi.org/10.1128/AEM.02034-17>.
65. Wichard T, Gerech A, Boersma M, Poulet SA, Wiltshire K, Pohnert G. Lipid and fatty acid composition of diatoms revisited: rapid wound-activated change of food quality parameters influences herbivorous copepod reproductive success. *ChemBioChem* [Internet]. 2007 [consultado 25 set 2019]; 8(10):1146-53. Disponible en : <https://doi.org/10.1002/cbic.200700053>.
66. Taipale S, Strandberg U, Peltomaa E, Galloway AW, Ojala A, Brett MT. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquat Microb Ecol* [Internet]. 2013 [consultado 25 set 2019]; 71:165-78. Disponible en : <https://doi.org/10.3354/ame01671>.
67. Wacker A, Piepho M, Harwood JL, Guschina IA, Arts MT. Light-induced changes in fatty acid profiles of specific lipid classes in several freshwater phytoplankton

- species. Front Plant Sci [Internet]. 2016 [consultado 25 set 2019]; 7(264):1-13. Disponible en : <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00264>.
68. Rubi Rorig L, Camargo Honorato M, Itokazu A, Ximenes de Macedo C, Deschamps F, Heberle Lins JV, *et al.* Ecophysiological and biochemical variation of the surf zone diatom *Asterionellopsis glacialis* sensu lato from Santa Catarina, Southern Brazil. Braz j oceanogr [Internet]. 2017 [consultado 25 set 2019]; 65(4):695-708. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-87592017118206504>.
 69. Hernández Acevedo H, Flores Ramos L, Ruiz Soto A. Ácidos grasos en cepas de microalgas del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Rev peru biol [Internet]. 2019 [consultado 25 set 2019]; 26(3):369-78. Disponible en : <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i3.15356>.
 70. So-Hyun K, Kwang-Hyeon L, Seok-Young L, Seong-Joo H, Byung-Kwan C, Hookeun L, *et al.* Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. Plos one [Internet]. 2013 [consultado 25 set 2019]; 8(9):e72415. Disponible en : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072415>.
 71. Hu G, Fan Y, Zhang L, Yuan C, Wang J, Li W, *et al.* Enhanced lipid productivity and photosynthesis efficiency in a *Desmodesmus* sp. mutant induced by heavy carbon ions. Plos one [Internet]. 2013 [consultado 25 set 2019]; 8(4): p. 1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060700>.
 72. Khozin-Goldberg I. Lipid metabolism in microalgae. In Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA. The physiology of microalgae [Internet]. Nueva York: Springer; 2016 [consultado 25 set 2019]:413-84. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_18.
 73. Rose S. A Lipidomics approach to the viral-host dynamics of the unicellular, eukaryotic alga *Chlorella variabilis* and its viral pathogen, PBCV-1 [Internet]. 2015 [consultado 25 set 2019]. Tesis en Ciencias Biológicas. Disponible en: <https://digitalcommons.unl.edu/dissertations/AAI3738581/>.
 74. Kumar Singh M, Kumar Rai P, Rai A, Singh S. Temperature induced changes in the lipid and fatty acid composition of the cyanobacterium *Scytonema geitleri* Bharadwaja. Current Trends in Biomedical & Life Sciences [Internet]. 2016

- [consultado 25 set 2019]; 1(1):25-30. Disponible en: <http://jujournals.ipublisher.in/I/a/4043>.
75. Xue C, Saito H, Zhang Z, Li Z, Yuepiao C, Ou C, *et al.* Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. Food Chem [Internet]. 2002 [consultado 25 set 2019]; 77:9-13. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00315-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00315-6).
 76. Herrero M, Vicente MJ, Cifuentes A, Ibáñez E. Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2007 [consultado 25 set 2019]; 11:1729-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/rcm.3017>.
 77. Fox JM, Zimba PV. Minerals and trace elements in microalgae. In Levine IA, Fleurence J. Microalge in health and disease prevention [Internet]. Londres: Academic Press; 2018 [consultado 25 set 2019]:177-193. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00008-6>.
 78. Kamar A. Turning the desert green and red [Internet]. Rishon Lezion (Israel): ynetnews; 2018 [consultado 29 oct 2019]. Disponible en: <https://www.ynetnews.com/articles/0,7340,L-5187505,00.html>.
 79. IMARPE. Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos [Internet]. Callao (Perú): IMARPE; 2018 [consultado 29 oct 2019]. Disponible en: http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index.php?id_seccion=I0170050400000000000000.

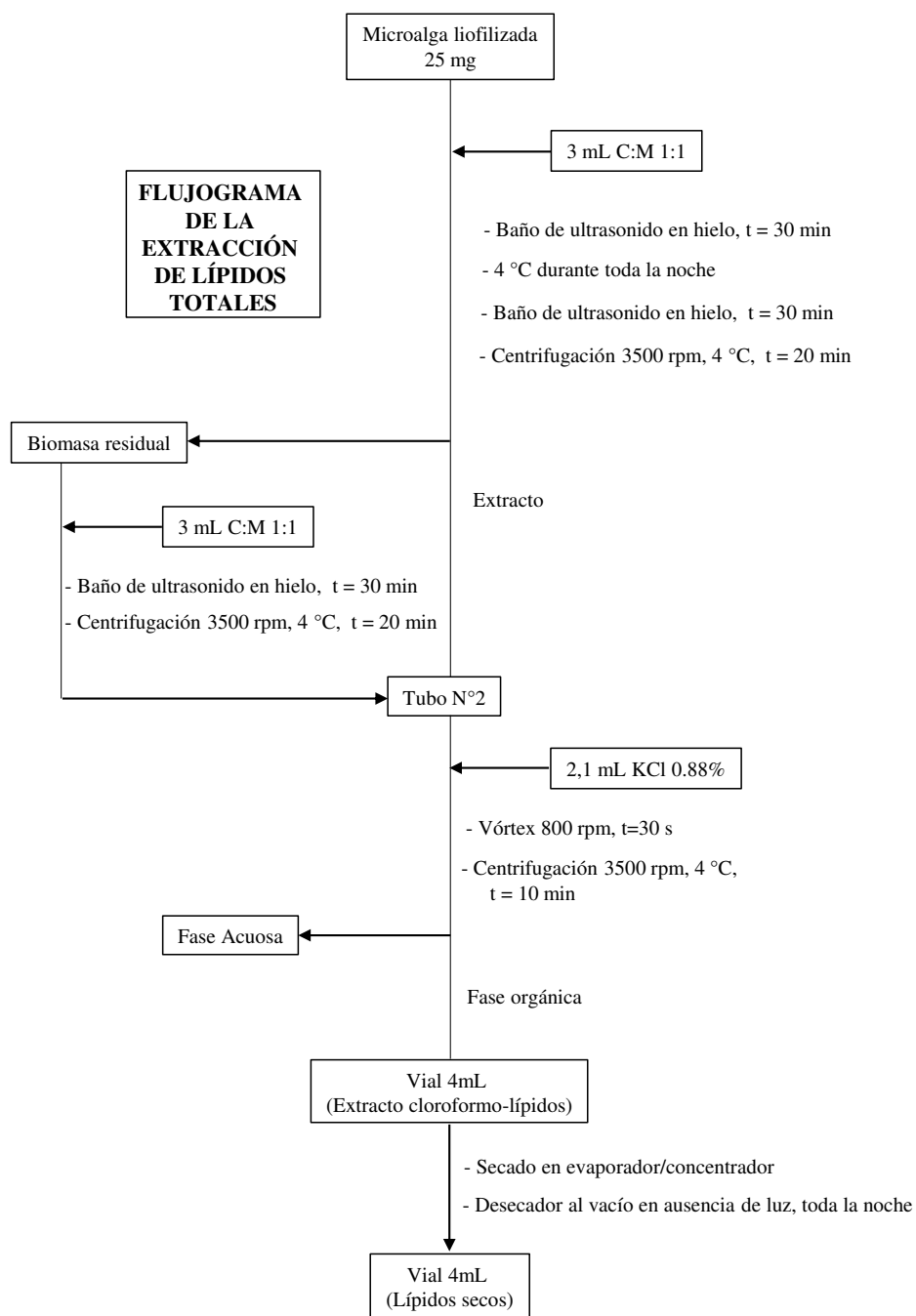


Figura 7. Flujoograma de la extracción de lípidos totales.

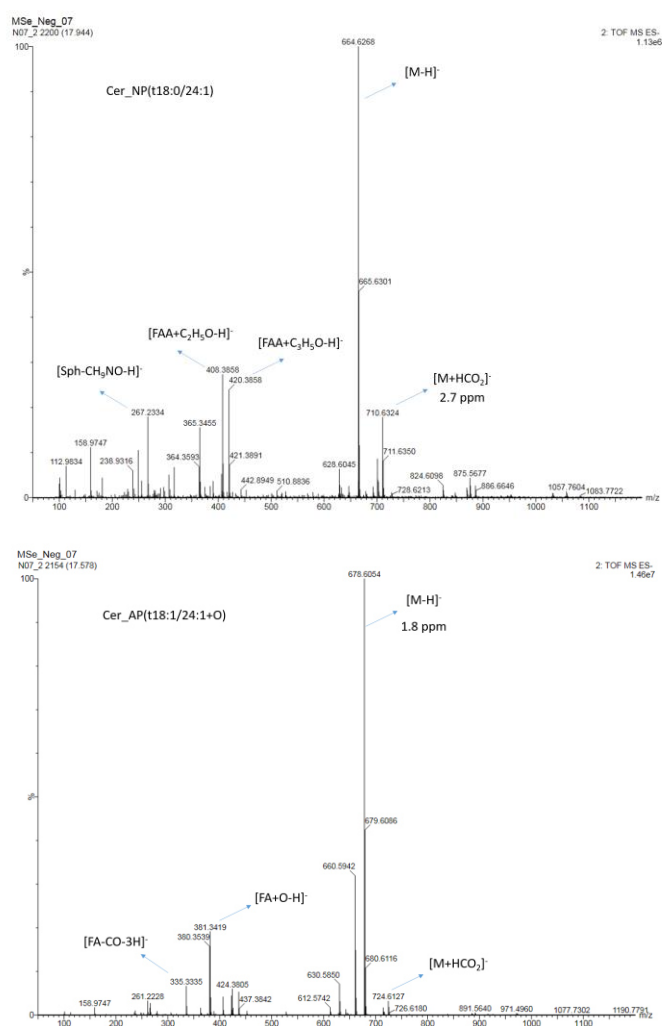


Figura 8. Espectro de masas típicos de las fitoceramidas Cer AP y Cer NP de la microalga *Ankistrodesmus falcatus*.

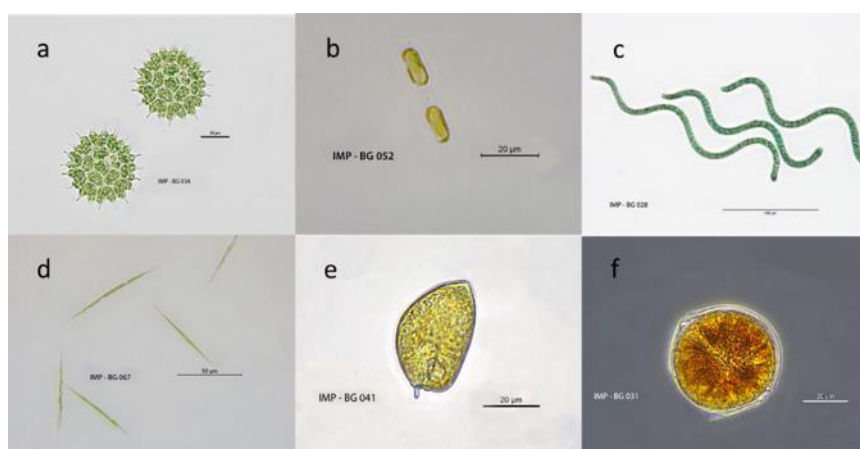
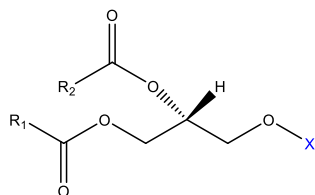


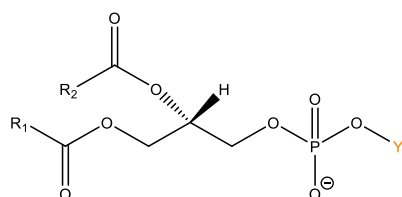
Figura 9. Fotos de microalgas del Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú⁷⁹. a: *Pediatrum* sp., b: *Skeletonema costatum*, c: *Arthrospira platensis*, d: *Ankistrodesmus* sp., e: *Prorocentrum micans*, f: *Alexandrium* sp.

Glicolípidos



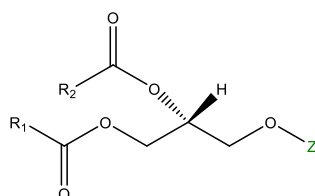
GL	X
MGDG	
DGDG	
SQDG	

Fosfolípidos



PL	Y
PA	H
PE	
PC	
PS	
PG	
PI	

Lípidos de Betaína



BL	Z
DGCC	
DGTS	
DGTA	

Figura 10. Estructuras químicas de los glicolípidos, fosfolípidos y lípidos de betaína.

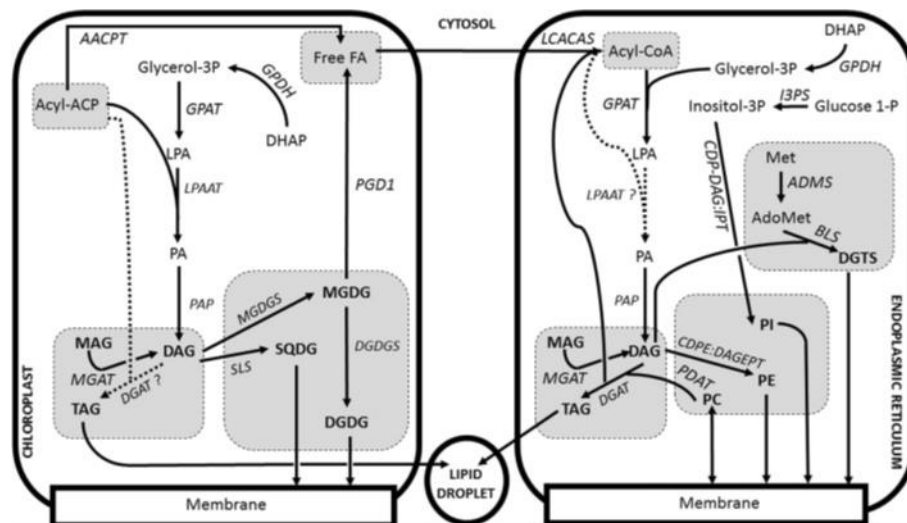


Figura 11. Esquema de la ruta de síntesis de lípidos polares y neutros en microalgas, extraído de Mimouni, *et al.*¹⁸.

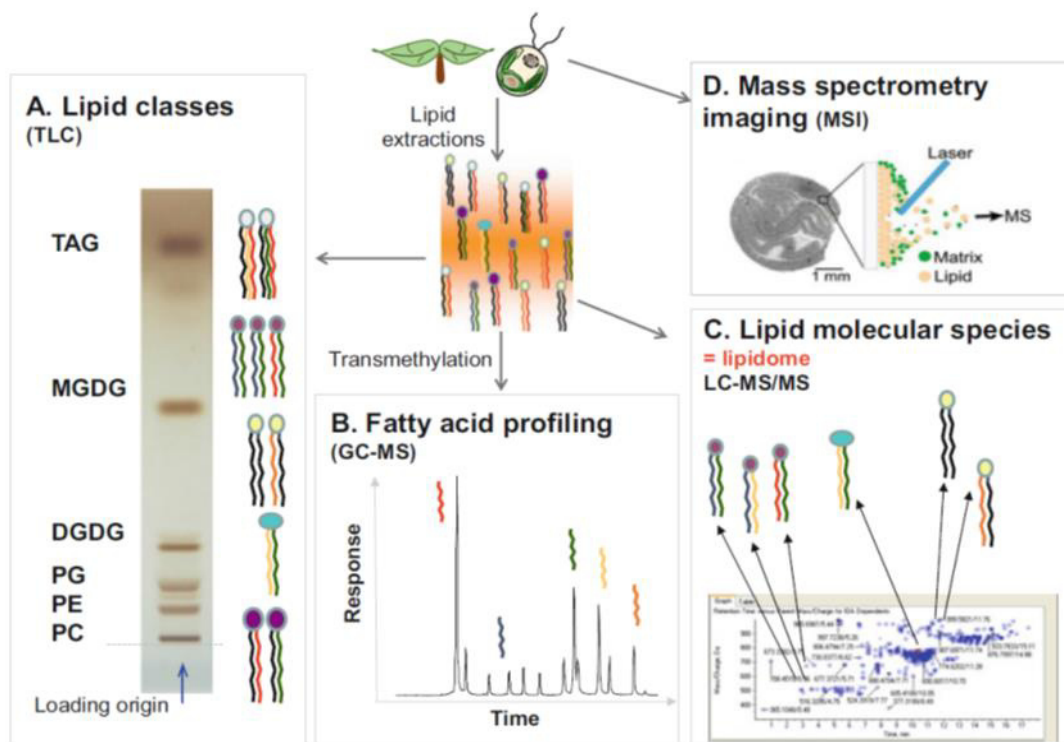


Figura 12. Herramientas analíticas más usadas en el análisis de lípidos, extraído de Li-Beisson, *et al.*²¹.

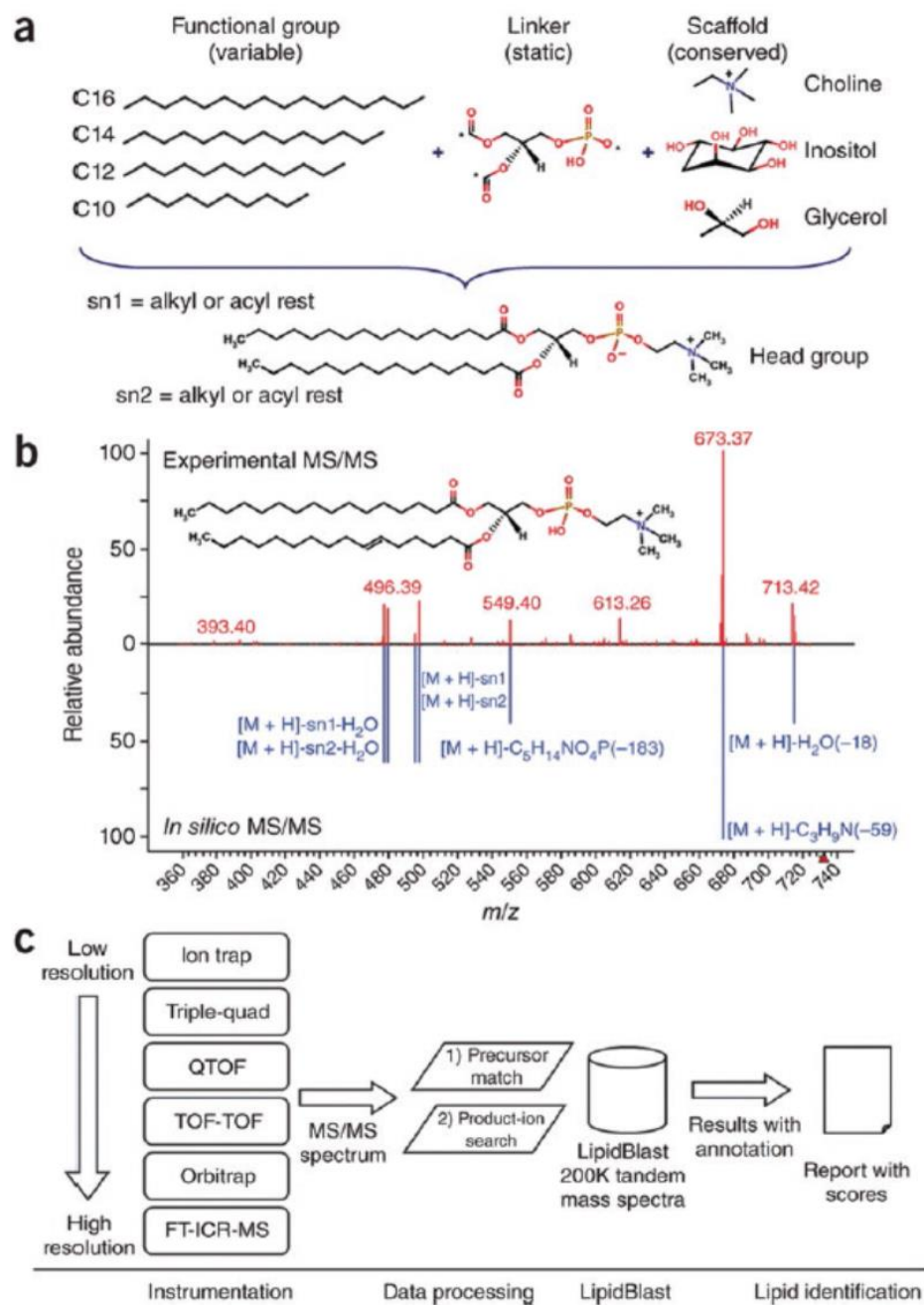


Figura 13. Proceso de crear, validar y aplicar los espectros MS/MS generados *in-silico* en el software Lipidblast, extraído de Cajka, *et al.*²².

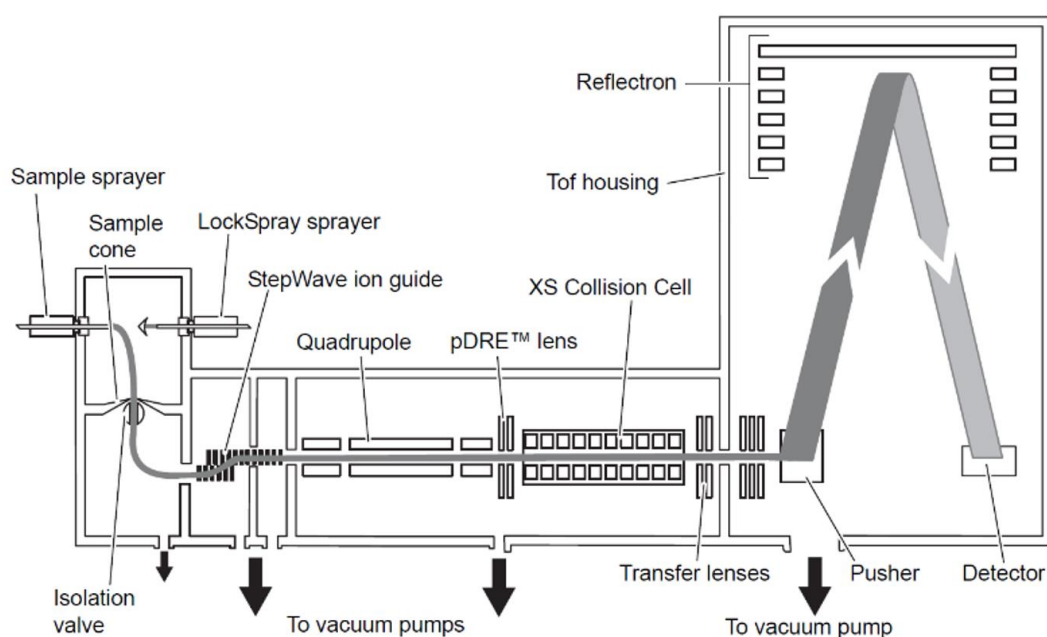
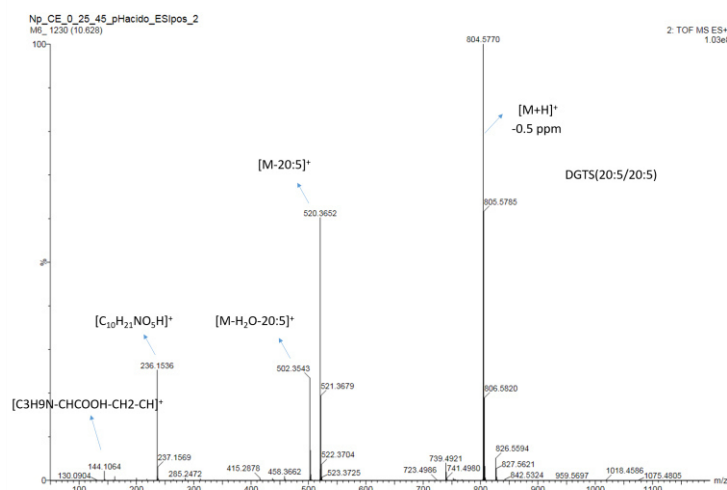
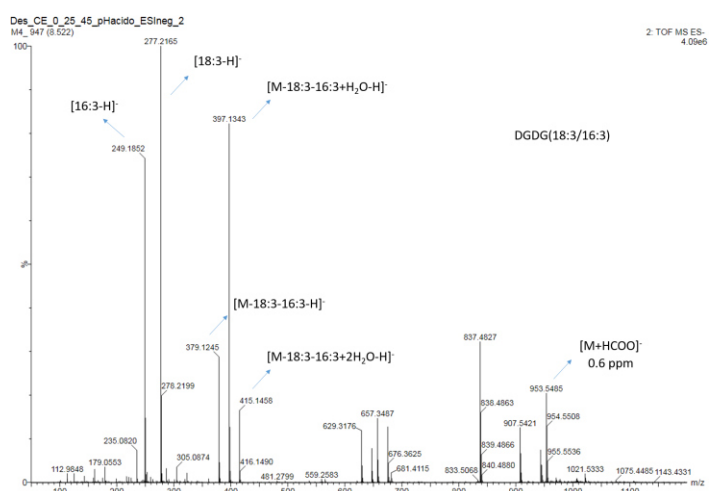
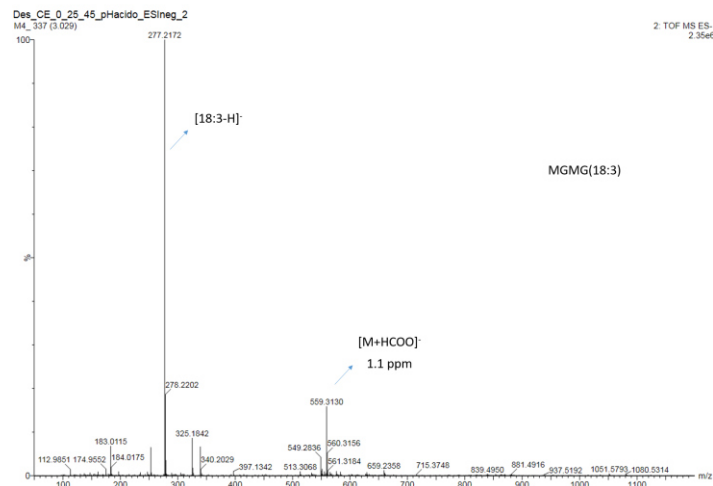
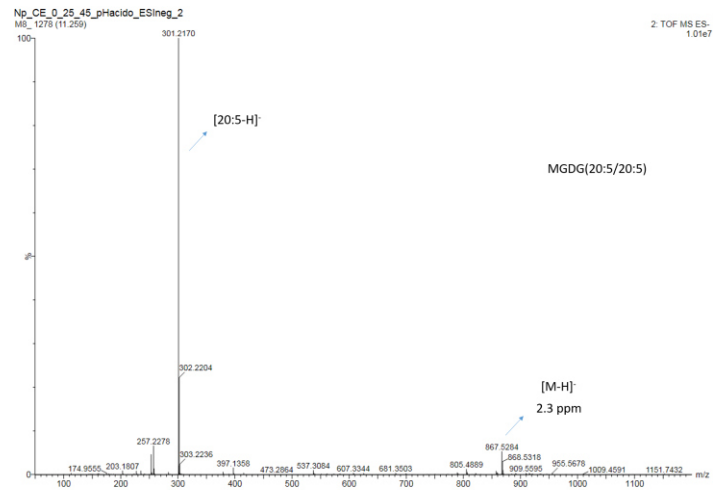
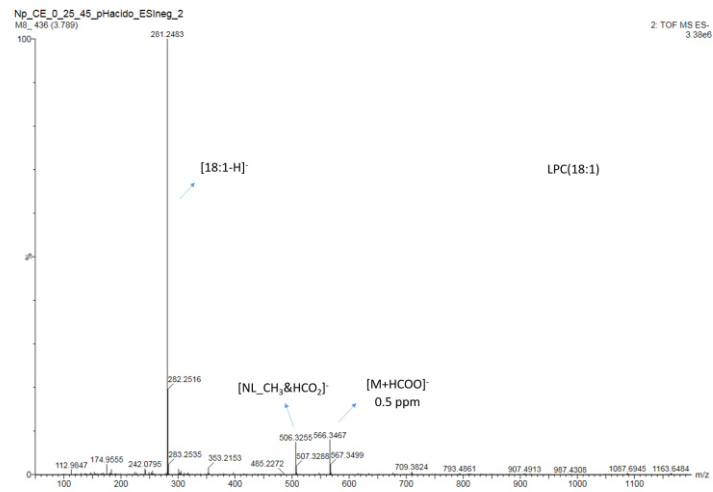


Figura 14. Esquema del espectrómetro de masas Waters Xevo G2-XS QTOF.





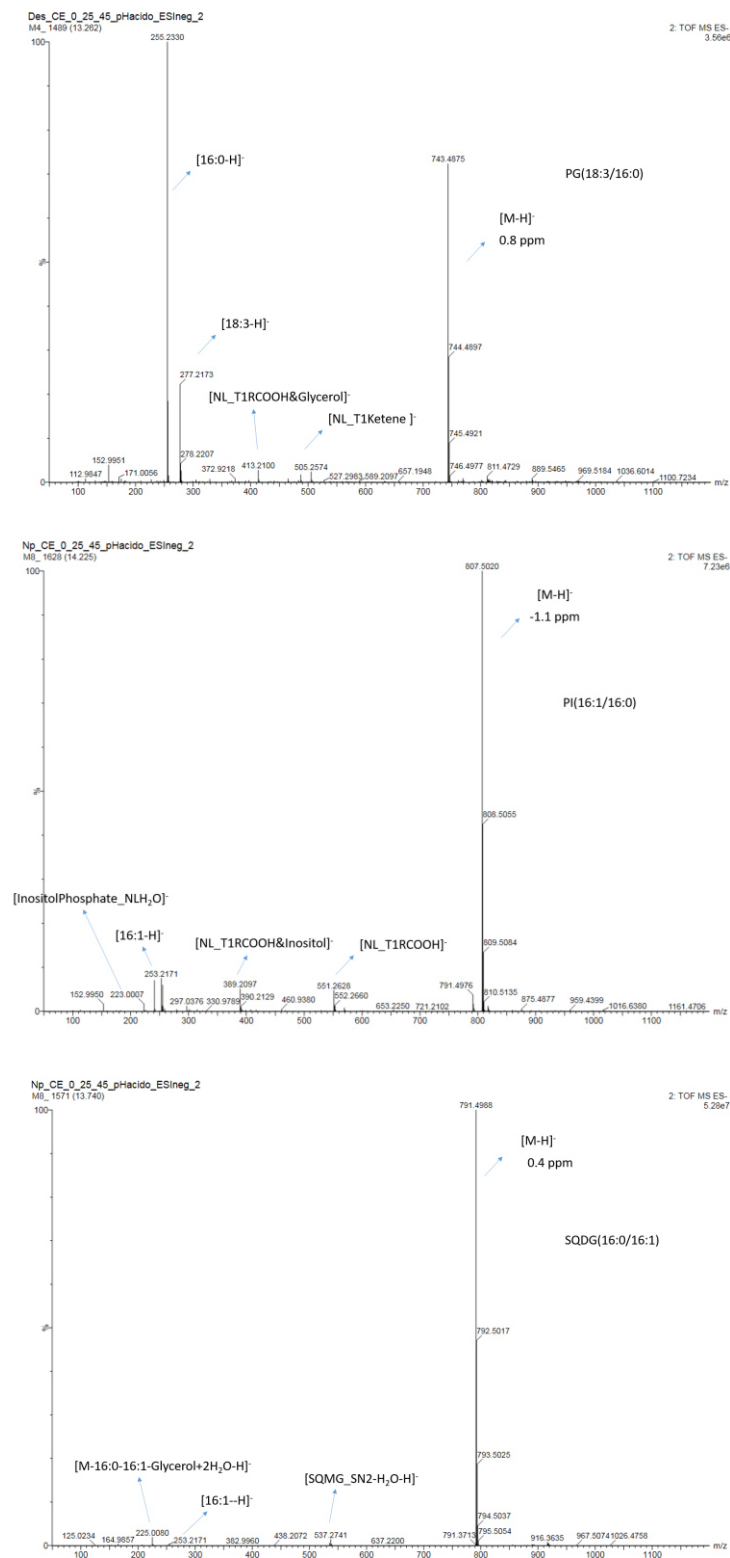


Figura 15. Espectros de masas típicos identificados.